

Mayara Anselmi

**O CROMOSSOMO 4 CONTÉM REGIÕES GENÔMICAS QUE
INFLUENCIAM A MEMÓRIA E A EMOCIONALIDADE EM
FÊMEAS**

Florianópolis

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA
E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DO COMPORTAMENTO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Mayara Anselmi

**O CROMOSSOMO 4 CONTÉM REGIÕES GENÔMICAS QUE
INFLUENCIAM A MEMÓRIA E A EMOCIONALIDADE EM
FÊMEAS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Geison de
Souza Izídio

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Anselmi, Mayara

O CROMOSSOMO 4 CONTÉM REGIÕES GENÔMICAS QUE INFLUENCIAM A
MEMÓRIA E A EMOCIONALIDADE EM FÊMEAS / Mayara Anselmi ;
orientador, Geison de Souza Izídio - Florianópolis, SC,
2016.

121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

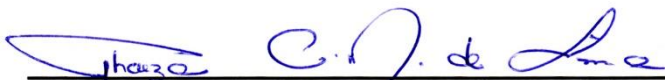
1. Farmacologia. 2. Ansiedade. 3. Anxrrl6. 4. Gene
Snca. 5. QTL, Expressão gênica, SHR . I. Izídio, Geison de
Souza . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

“O cromossomo 4 contém regiões genômicas que influenciam a memória e a emocionalidade em fêmeas”

Por

Mayara Anselmi

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (02/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



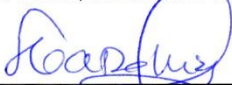
Dr(a) Geison de Souza Izídio (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Sâmia Regiane Lourenço Joca (Universidade de São Paulo)



Dr(a) Eloisa Pavesi (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Antonio de Pádua Carobrez (Universidade Federal de Santa Catarina)



Me(a) Gabriela Ferreira de Medeiros (Université de Bordeaux – videoconferência)

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2016.

“Aos meus amados pais, Solange e Elair
Ao meu namorado, Ricardo Filipe Riffel
Ao meu orientador e amigo, Geison de Souza Izídio”

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Geison de Souza Izídio por todo o apoio e dedicação durante o tempo que trabalhamos juntos, desde a minha iniciação científica até o término desse trabalho. Obrigada pela paciência, confiança e pelos ensinamentos que muitas vezes vão além do campo científico. Fica um fantástico orientador, permanece um eterno amigo.

Ao Prof. Dr. André de Ávila Ramos pela orientação nos primeiros passos da minha vida acadêmica. Obrigada por acreditar em mim e pelas valorosas discussões ao longo desse processo, sua contribuição foi muito importante.

À minha amiga Fernanda Junkes Corrêa, presente que o mestrado me deu. Obrigada por toda cumplicidade, paciência e carinho com que sempre me ajudou na vida acadêmica e principalmente fora dela. Você é muito especial!

Às minhas amigas de laboratório Natalli Granzotto e Pâmela Ramborger por toda a colaboração com os experimentos, parceria e risadas durante a realização desse trabalho. Levo a amizade de vocês para a vida!

Aos atuais e antigos alunos do laboratório, obrigada pelos momentos de alegria e angústias compartilhados e pelo auxílio nas mais diversas etapas no desenvolvimento deste trabalho, sempre muito solícitos e gentis. Em especial à Ana Velázquez Chávez, Guilherme Fadanni e Thalita Mello Alves que participou deste trabalho.

A todos da “família” LCG que mesmo após terem concluído o vínculo acadêmico permanecem como grandes amigos, em especial à Dra. Renata Pértile pela amizade, paciência e pela importantíssima ajuda no início deste trabalho.

À Prof. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard do Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de desenvolver parte dos experimentos de expressão gênica em seu laboratório.

Às doutorandas Luana Martins de Carvalho e Samara Damasceno por todo o apoio técnico e parceria na realização dos experimentos de expressão gênica e pelo companheirismo no tempo que estive em Belo Horizonte.

Aos Prof. Drs.: Antonio de Pádua Carobrez, Samia Regiane Lourenço Joca, Gabriela Ferreira de Medeiros e Eloisa Pavesi pela disponibilidade e contribuições como banca examinadora na avaliação deste trabalho.

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Farmacologia, Departamento de Biologia Celular, Embiologia e Genética e Secretaria Integrada de Pós Graduação.

Aos meus pais, Solange e Elair, meus maiores incentivadores. Obrigada por sempre me apoiarem e me depositarem confiança em todas as situações. O amor, esforço e incentivo de vocês é essencial para seguir em frente, sempre. Meu eterno agradecimento, amor e orgulho. Também a minha irmã Samara pelo companheirismo, parceria e amor durante toda a minha vida.

Ao meu namorado, Ricardo Filipe Riffel, pelo amor, cumplicidade e companheirismo que dedicamos um ao outro. Agradeço pela compreensão, ajudas acadêmicas e pela presença constante em todos os momentos da minha vida. Seu amor e incentivo são fundamentais.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

“Há mais pessoas que desistem do que pessoas que fracassam”
(Henry Ford)

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”
(Cora Coralina)

RESUMO

As linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) têm sido consideradas ferramentas poderosas para os estudos genéticos envolvendo ansiedade/emocionalidade. Entretanto, permanecem dúvidas se as diferenças encontradas entre as linhagens seriam somente relacionadas à ansiedade/emocionalidade ou também poderiam ser devido às diferenças na memória/aprendizado. Assim, com o objetivo de buscar regiões genômicas no cromossomo 4 das fêmeas, que estejam envolvidas no controle da ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado, bem como melhor compreender a relação entre os testes comportamentais, que envolvam estes componentes, realizou-se: a) uma análise de QTL (*loci* para características quantitativas) para identificar essas regiões genômicas e uma análise de fator utilizando variáveis dos testes comportamentais (Labirinto em cruz elevado modificado, Campo aberto, Reconhecimento de objeto, Alternação espontânea e Medo condicionado contextual) relacionados à ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado; b) utilizou-se a linhagem SHR.LEW.Anxrr16 (*Anxiety related response QTL 16*) (SLA16) e SHR para confirmar os QTL previamente encontrados na presente análise de QTL e; c) analisou-se a expressão do gene *Snca* (que codifica a proteína Alfa-sinucleína) nas fêmeas das linhagens SLA16 e SHR. Os resultados revelaram: a) três QTL que influenciam medidas relacionadas à emocionalidade, memória e locomoção; quatro fatores com relações entre as variáveis de ansiedade/emocionalidade e memória. Além disso, b) foram encontradas diferenças comportamentais contrastantes entre as linhagens SLA16 e SHR nos testes utilizados para avaliar ansiedade/emocionalidade. Porém, em testes envolvendo memória/aprendizado apenas quando os mesmos envolviam componentes emocionais foram observadas diferenças significativas. Por fim, c) a expressão do gene *Snca* no hipocampo e estriado das fêmeas da linhagem SHR é maior que nas da linhagem SLA16. Então, neste trabalho foram mapeados novos QTL, influenciando ansiedade/emocionalidade e memória aprendizado, que foram confirmados nas linhagens SLA16 e SHR e possivelmente o gene *Snca* seja um bom candidato para as diferenças comportamentais entre elas.

Palavras-chave: Ansiedade. *Anxrr16*. Gene *Snca*. QTL. Expressão gênica. SHR

ABSTRACT

The inbred rat strains Lewis (LEW) and *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) have been considered powerful tools for genetic studies involving anxiety/emotionality. However, some doubts remain if the behavioral analysis differences between strains would only be related to anxiety/emotionality or could also be due to differences in memory/learning. Thus, we searched genomic regions on chromosome 4 were analysed, of the females, which are involved in anxiety/emotionality and memory/learning related behaviors. We also try better understanding the relationship between behavioral tests involving these components. Then we: a) performed a QTL (quantitative trait *loci*) analysis to identify genomic regions and a factor analysis using some behavioral variables from anxiety/emotionality and memory/learning behavioral tests; b) we used a congenic strain, named SHR.LEW.Anxrr16 (*Anxiety related response QTL 16*) (SLA16), to confirm the QTL effects previously found in the present study and; c) we analyzed the *Snca* gene expression in SLA16 and SHR females strains. The results revealed a) three QTL influencing data related to emotionality, memory and locomotion; 4 factors between behaviors related to anxiety/emotionality and learning/memory. Moreover, we found b) contrasting behavioral differences between SLA16 and SHR strains in anxiety/emotionality behavioral tests. However, significant differences were observed in tests involving memory/learning only when they involved emotional components. Finally, *Snca* expression in the hippocampus and *striatum* of SHR females was higher than SLA16. In summary, in this study we have mapped new QTL for anxiety/emotionality and memory/learning related behaviors, they were using SLA16 and SHR rats and possibly the *Snca* gene is a potential candidate gene to behavioral differences between these inbred strains.

Keywords: Anxiety. *Anxrr16*. *Snca* gene. QTL. Gene expression. SHR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Série de cruzamentos envolvidos na construção da linhagem congênica SLA16.	37
Figura 2 - Aparato utilizado no teste do LCEM.....	49
Figura 3 - Aparato utilizado no teste do CA.....	50
Figura 4 – Esquema utilizado no teste do RO	51
Figura 5 – Aparato utilizado no teste de AE.....	52
Figura 6 – Aparato utilizado no teste do MC.	53
Figura 7 - Mapa genético originado a partir dos dados genotípicos obtidos com os 10 marcadores moleculares utilizados em todos os animais da população F2 desse estudo.	57
Figura 8 – Aparato utilizado no teste do CA.	61
Figura 9 – Aparato utilizado no teste de AE.....	62
Figura 10 - QTL significativo encontrado para a medida “Tempo no centro” na sessão treino do LCEM na análise de ligação realizada com 96 fêmeas F2 LEW/SHR.....	70
Figura 11 - QTL significativo encontrado para a medida “Tempo no braço não aversivo” na sessão teste do LCEM na análise de ligação realizada com 96 fêmeas F2 LEW/SHR	71
Figura 12 – QTL significativo encontrado para a medida “locomação periférica” no CA na análise de ligação realizada com 96 fêmeas F2 LEW/SHR.....	72
Figura 13 - QTL sugestivos encontrados na análise de ligação com as 96 fêmeas F2 LEW/SHR para porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos do LCEM; número de entradas no braço aversivo do LCEM; tempo no braço aversivo do LCEM; locomoção central do CA.....	73
Figura 14 – Genótipos dos animais segundo o marcador D4Rat76 para o fenótipo “tempo no centro” na sessão treino do LCEM; genótipo dos animais segundo o marcador D4Rat49 para o fenótipo “tempo no centro” na sessão treino do LCEM; genótipos dos animais segundo o marcador D4Rat59 para o fenótipo “tempo no braço não aversivo” da sessão teste do LCEM; genótipos dos animais segundo o marcador D4Mgh11 para o fenótipo “tempo no braço não aversivo” da sessão teste do LCEM; genótipos dos animais segundo o marcador D4Mgh6 para o fenótipo “locomação periférica” do CA	75

Figura 15 - Percentual de tempo gasto nos braços aversivos na sessão de treino e teste do LCEM.	76
Figura 16 - Percentual de tempo gasto nos braços abertos na sessão de treino e teste do LCEM.	77
Figura 17 - Tempo gasto nos braços não aversivos na sessão teste do LCEM.	78
Figura 18 - Tempo gasto no centro do LCEM na sessão treino	78
Figura 19 - Número de entradas totais na sessão de treino e teste do LCEM.	79
Figura 20 - Número de quadrados cruzados na região central e periférica e tempo gasto na área central do CA.	80
Figura 21 - Índice de discriminação de objetos e tempo de exploração dos objetos.	81
Figura 22 - Porcentagem de alternância espontânea e total de entradas nos braços do teste de AE.	81
Figura 23 – Duração do comportamento de congelamento e número de tentativas de escape durante as fases de pré-condicionamento e condicionamento durante a sessão de treino e após o condicionamento do medo contextual na sessão de teste.	82
Figura 24 — Quantidade de RNAm (normalizado em relação ao gene <i>Gapdh</i> e <i>Ppia</i>) do gene <i>Snca</i> no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado, das fêmeas das linhagens SLA16 e SHR	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Informações sobre os marcadores moleculares do tipo
microsatélite utilizados na genotipagem dos
animais.....56

Quadro 2 - Informações sobre as sequência de *primers* utilizados para
PCR em tempo
real.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de fator de traços fenotípicos quantificados em fêmeas da	geração	F2
LEW/SHR.....		69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE= Alteração espontânea
ANOVA = Análise de variância
Anxrr16 = *anxiety related response QTL* 16 (QTL para resposta relacionada à ansiedade 16)
CA = Campo Aberto
CBP = Caixa Branca e Preta
cDNA = DNA complementar
cM = centimorgan
Gapdh – glicerolaldeído-3-fosfatodehidrogenase
HPA = hipotálamo-pituitária-adrenal
ID = Índice de Discriminação
LCE = Labirinto em Cruz Elevado
LCEM= Labirinto em Cruz Elevado Modificado
LEW = Lewis
LGC = Laboratório de Genética do Comportamento
LOD = Logaritmo de odds
MC= Medo Condicionado Contextual
Mpb = Mega Pares de Base
Npy = Neuropeptídeo Y
Ofill = *open field inner locomotion* 1 (locomção central no campo aberto 1)
PCR = *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
Ppia = peptidilprolil isomerase A
QTL = *quantitative trait locus* (*locus* para característica quantitativa)
RGD = *Rat genome database* (banco de dados do genoma do rato)
RNAm = RNA mensageiro (messenger ribonucleic acid)
RO= Reconhecimento de Objetos
SHR = *Spontaneously Hypertensive Rat* (rato espontaneamente hipertenso)
SLA16 = SHR.LEW.*Anxrr16*
*Snc*a = gene da alfa-sínucleína
SNP = *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)
Tacr1 = gene do receptor NK1 da substância P.
TDAH = Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TEPT = Transtorno de Estresse Pós-Traumático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
1.1	MODELOS GENÉTICOS NAS PESQUISAS BIOMÉDICAS	31
1.1.1	Linhagens Lewis e SHR.....	33
1.2	ANÁLISE DE QTL	34
1.3	CROMOSSOMO 4 E A ANSIEDADE/EMOCIONALIDADE.....	36
1.4	A LINHAGEM CONGÊNICA SLA16	37
1.5	GENE CANDIDATO	40
1.6	INTER-RELAÇÃO ENTRE ANSIEDADE/EMOCIONALIDADE E MEMÓRIA/APRENDIZADO	40
1.7	IMPORTÂNCIA DE ESTUDAR FÊMEAS.....	42
2	HIPÓTESES.....	45
3	OBJETIVOS:	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	ANIMAIS	49
4.2	PRODUÇÃO DOS ANIMAIS F2.....	49
4.3	FENOTIPAGEM.....	50
4.3.1	Labirinto em Cruz Elevado Modificado.....	50
4.3.2	Campo Aberto	52
4.3.3	Reconhecimento de Objetos.....	53

4.3.4	Alternação Espontânea.....	54
4.3.5	Medo Condicionado.....	56
4.4	ANÁLISE DE FATOR.....	57
4.5	GENOTIPAGEM.....	58
4.5.1	Gel de agarose.....	60
4.6	ANÁLISE DE QTL	60
4.7	ANIMAIS	62
4.8	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	63
4.8.1	Labirinto em Cruz Elevado Modificado	63
4.8.2	Campo Aberto.....	63
4.8.3	Reconhecimento de Objetos.....	64
4.8.4	Alternação Espontânea.....	64
4.8.5	Medo Condicionado.....	65
4.9	EXPRESSÃO GÊNICA	66
4.9.1	Material biológico para análise de expressão gênica ...	66
4.9.2	Extração de RNA	66
4.9.3	Preparação dos primers para Real time-PCR	66
4.9.4	Síntese do cDNA.....	67
4.9.5	PCR em tempo real	68
4.9.6	Normalização dos dados de PCR em tempo real	68
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	69
5	RESULTADOS.....	71
6	DISCUSSÃO	87
6.1	PRIMEIRA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	87
6.2	SEGUNDA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	93

6.3	TERCEIRA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	101
7	CONCLUSÕES.....	105
	REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODELOS GENÉTICOS NAS PESQUISAS BIOMÉDICAS

Os modelos genéticos animais são utilizados nas pesquisas biomédicas em razão das suas características fisiológicas, orgânicas e anatômicas muitas vezes serem compartilhadas com as de humanos (TECOTT, 2003). É possível assim, através da medicina comparativa, que a caracterização de genes/proteínas ou mesmo dos processos anteriormente citados (em estado normal ou patológico), possam ser estudados em determinadas espécies e o conhecimento adquirido possa ser usado em outras espécies (BRYDA, 2013).

Nesse sentido, os roedores vêm se destacando como modelos a serem utilizados nas pesquisas biomédicas. Roedores, em especial ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*), são animais de pequeno porte, fáceis de serem alojados e manipulados, possuem custo relativamente baixo para serem mantidos (AITMAN et al., 2008). Somado a isso, o ciclo de vida curto apresentado por esses animais os faz especialmente interessantes nos estudos genéticos, pois permite o estudo de várias gerações. Ainda no campo dos estudos genéticos: o ambiente laboratorial poder ser controlado, bem como os efeitos genéticos, fazendo desses animais uma poderosa ferramenta para ser utilizada nesse campo (MASHIMO; SERIKAWA, 2009).

Além das similaridades já pontuadas há também a similaridade genética entre humanos e ratos/camundongos. Há aproximadamente 75 milhões de anos, sugere-se através de análises de genômica comparativa, um ancestral comum a essas três espécies (MADSEN et al., 2001; MURPHY; EIZIRIK; JOHNSON, 2001). O sequenciamento do genoma humano em 2001, do camundongo em 2002 e do rato em 2004 possibilitou muitas análises genômicas e revelou que as três espécies possuem aproximadamente 95% dos seus genes compartilhados (BRYDA, 2013).

Nas pesquisas biomédicas, a escolha preferencial dos geneticistas por camundongos (AITMAN et al., 2008) normalmente reflete o avanço técnico/metodológico (por exemplo, *knockout*) que essa espécie sofreu em virtude de ter sido a primeira espécie de roedores a possuir o genoma totalmente sequenciado (GREGORY et al., 2002). O rato (*Rattus*

norvegicus), por sua vez, também começou a ganhar maior espaço nas pesquisas após ter seu genoma também sequenciado (GIBBS et al., 2004). Além disso, é a espécie de mamífero pioneira usada na pesquisa, ao longo de mais de 150 anos. Por possuir um perfil farmacocinético já bem definido há a preferência pelo seu uso nos estudos que envolvem pesquisas pré-clínicas, farmacologia, neurobiologia e toxicologia (JACOB; VRIES; CORRENS, 1999; LAZAR et al., 2005). Diversas comparações podem ser feitas entre a sequência genômica do rato, camundongo e de humanos através de banco de dados disponíveis na internet e análises de bioinformática, especialmente no que diz respeito à descoberta de genes e estudos de genômica comparativa. Nesse sentido, pode-se destacar o RGD (*Rat Genome Database*) como uma das principais plataformas que reúne dados genotípicos e fenotípicos, possibilitando uma ferramenta de consulta gratuita sobre um grande volume de dados acumulados de pesquisas mundiais.

Os testes comportamentais se fazem necessários para a compressão de mecanismos subjacentes de fenômenos essencialmente humanos como: depressão, alcoolismo, ansiedade, etc. Levando isso em consideração, o uso de animais não humanos (especialmente do rato de laboratório) pode ajudar, pelo menos em parte, a responder algumas perguntas, uma vez que alguns parâmetros podem ser medidos através de manifestações de respostas comportamentais e fisiológicas. Nessa perspectiva, ao longo os anos, o rato foi utilizado em muitas pesquisas relacionadas à emocionalidade/ansiedade (CHIAVEGATTO et al., 2009; DE MEDEIROS et al., 2013; HAMEISTER et al., 2008; IZÍDIO et al., 2005, 2011; MILLER; MORRISON; MCEWEN, 2012; RAMOS et al., 1999; VENDRUSCULO et al., 2006), demonstrando-se um bom modelo de estudo para esses comportamentos.

As linhagens isogênicas (*inbred strain*) são linhagens em que todos os animais possuem altíssima homologia entre seus genomas, sendo muitas vezes considerados clones genéticos uns dos outros. Essa homologia deve-se ao fato de pelo menos por 20 gerações de cruzamentos consanguíneos. A primeira linhagem de ratos isogênicos foi proposta em 1909, por King e colaboradores e desde então, centenas de linhagens foram criadas (AITMAN et al., 2008) entre elas, modelos para estudos comportamentais de TDAH (Transtorno do *déficit* de atenção e hiperatividade) (HOWELLS; BINDEWALD; RUSSELL, 2009; SAGVOLDEN, 2000) e consumo espontâneo de álcool (BICE et al., 1998).

Com a finalidade de encontrar genes que contribuam para diferenças de um determinado fenótipo é comum o uso de linhagens isogênicas que contrastem para o fenótipo em questão (RAMOS et al., 2003). Assim, por serem criadas no mesmo ambiente, pode-se dizer que as diferenças comportamentais que, por ventura, sejam encontradas entre diferentes linhagens isogênicas possivelmente sejam de origem genética. Ao contrário, dentro de uma mesma linhagem isogênica o ambiente deve ser o responsável por grande parte das diferenças encontradas.

1.1.1 Linhagens Lewis e SHR

As linhagens de ratos Lewis (LEW) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) são exemplos de linhagens isogênicas usadas no estudo da emocionalidade e vêm, ao longo dos estudos do presente grupo de pesquisa e de outros pesquisadores independentes, demonstrando-se poderosas ferramentas para os estudos genéticos envolvendo ansiedade/emocionalidade (CHIAVEGATTO et al., 2009; RAMOS; MORMEDE, 1998; RAMOS et al., 1997, 2002; VENDRUSCULO et al., 2006). A partir de um estudo de Ramos et al. (1997), essas duas linhagens foram propostas como modelo genético para o estudo da ansiedade/emocionalidade. Dentre as seis linhagens avaliadas, LEW e SHR foram as que mais contrastaram quanto à aproximação/esquiva em uma série de testes comportamentais: campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa branca e preta (CBP) e não diferiram significativamente quanto à atividade locomotora (RAMOS et al., 1997).

Ao longo do tempo, em diversos estudos, a linhagem LEW exibe mais comportamentos de defesa em relação à linhagem SHR, sugerindo que ela apresente maiores índices de emocionalidade, tendendo a evitar locais aversivos nos mais variados testes comportamentais (CHIAVEGATTO et al., 2009; IZÍDIO et al., 2011; RAMOS et al., 1997). Já a linhagem SHR exibe menos esse comportamento de defesa ao se aproximar e explorar mais as áreas aversivas, sendo considerada assim com menores índices de emocionalidade.

A linhagem LEW possui na maioria das vezes uma hiporresponsividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (STERNBERG et al., 1992) e é avaliada em estudos que investigam o consumo de drogas devido a sua característica de autoadministra-las (PICETTI et al., 2010, 2012). Somado a isso, a literatura propõe que os

ratos da linhagem LEW possam ser um bom modelo para o estudo do TEPT (transtorno de estresse pós-traumático) por apresentarem *déficits* na extinção de memórias traumáticas e após serem expostos a uma ameaça predatória manifestarem comportamentos de ansiedade extrema (COHEN; MATAR; RICHTER-LEVIN, 2006; GOSWAMI et al., 2012). A linhagem SHR exibe comportamentos impulsivos, de hiperatividade e vem sendo proposta como uma linhagens modelo de TDAH devido ao desempenho reduzido relacionado aos testes que envolvam atenção bem como à memória/aprendizado (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN, 2000; SAGVOLDEN et al., 2005).

Essas mesmas linhagens foram estudadas por Ramos et al. (2002) utilizando o teste labirinto em T. Através desse teste há a possibilidade do animal adquirir a esQUIVA inibitória dos braços abertos após vários ensaios consecutivos. A pior aprendizagem e recuperação da memória foi apresentada pelos ratos da linhagem SHR (RAMOS et al., 2002). Esse trabalho incentiva a continuação das pesquisas com essas linhagens isogênicas no sentido de investigar se as diferenças encontradas entre elas seriam somente relacionadas à ansiedade/emocionalidade ou também poderiam ser devido às diferenças na memória/aprendizado, ou ainda, se os fatores emocionais poderiam influenciar de alguma forma a memória/aprendizado.

1.2 ANÁLISE DE QTL

As características quantitativas são características que variam continuamente ao longo das populações, são influenciadas pelo ambiente e por diversos genes que contribuem cada um com uma parte do fenótipo (MOORE; NAGLE, 2000; PLOMIN; OWEN; MCGUFFIN, 1994). Entre elas, as diferenças comportamentais como a ansiedade, a memória e o aprendizado são exemplos desse tipo de característica. As regiões genômicas que contribuem para essa variação denominam-se *locus* para características quantitativas ou QTL (*Quantitative Trait Locus*, do inglês) (PLOMIN; OWEN; MCGUFFIN, 1994). Através do mapeamento dessas regiões, *locus* relacionados à característica de interesse podem ser identificados, bem como genes, seus produtos gênicos e mecanismos subjacentes (FLINT et al., 2005).

Para a realização da análise de QTL são utilizadas duas linhagens parentais, preferencialmente linhagens isogênicas, que contrastem para a característica de interesse do estudo (MAURICIO, 2001). O intercruzamento origina uma F1 e a partir daí há basicamente duas maneiras de se dar continuidade: originando uma F2 (a partir do intercruzamento da F1) ou retrocruzando animais da F1 com uma das linhagens parentais. Estudos utilizando a geração F2 são mais comumente encontrados, mas a escolha varia de acordo com a característica que se deseja estudar e a forma como o QTL é herdado (MOORE; NAGLE, 2000). O próximo passo é a caracterização fenotípica dos animais (por exemplo, da F2) em testes comportamentais relacionados ao fenótipo estudado e a genotipagem utilizando marcadores moleculares polimórficos espalhados pela região do genoma que há interesse (ou por todo o genoma, se for o caso). Programas computacionais permitem que os dados fenotípicos e genotípicos sejam correlacionados e revelam regiões do genoma (ou *locus*) que possuam alta probabilidade de estarem associadas à característica de interesse (FLINT et al., 2005).

O estudo de Ramos et al. (1999) revelou o primeiro QTL em ratos para características relacionadas à ansiedade/emocionalidade através de uma análise de QTL utilizando as linhagens isogênicas LEW e SHR (RAMOS et al., 1997, 2002). O QTL em questão afetava a locomoção central do campo aberto (CA) (um parâmetro utilizado para medir a ansiedade/emocionalidade) em fêmeas e atualmente encontra-se no RGD (Rat Genome Database) como *Anxrr16* (*Anxiety related response QTL 16*). O QTL *Anxrr16* está localizado no cromossomo 4, em uma região de 86.3 Mpb (confirmada posteriormente), (MEDEIROS; CORRÊA; CORVINO, 2014a) e com um LOD score de 7.22, transformando-o no segundo maior QTL relacionado à ansiedade em ratos. É importante ressaltar que esse QTL foi encontrado somente em fêmeas e apresentava um efeito contraintuitivo (RAMOS et al., 1999), uma vez que os animais que iam mais vezes no centro do CA possuíam alelos LEW (considerados mais “ansiosos”) ao invés de alelos SHR (considerados menos “ansiosos”), como era de se esperar. Esse efeito contraintuitivo pode ocorrer devido à recombinação genética que ocorre nos animais F2 e não é raro de ser encontrado em estudos com QTL (CALDARONE et al., 1997; LLAMAS et al., 2005; SILVA et al., 2007).

1.3 CROMOSSOMO 4 E A ANSIEDADE/EMOCIONALIDADE

A metodologia da análise de QTL apresenta algumas limitações dentre as quais: é desejável que o tamanho amostral necessário para a análise seja relativamente grande; a descoberta de regiões que envolvam um grande número de genes que contribuam conjuntamente para a característica de interesse ou mesmo mais de um QTL influenciando-a (ABIOLA et al., 2003; (FLINT, 2002; FLINT et al., 2005). Entretanto, a região do QTL *Anxrr16* continua a ser investigada devido a estudos que evidenciam cada vez mais a sua importância como região que influencia comportamentos relacionados à emocionalidade (brevemente resumidos abaixo, para revisão ver (MEDEIROS; CORRÊA; CORVINO, 2014a).

O primeiro trabalho que reproduz os efeitos do *Anxrr16* foi feito em 2002 por Mormede et al. (2002). Nesse trabalho através da F4 e F5 oriundas do intercruzamento das mesmas linhagens, LEW e SHR, há a produção de duas linhagens “*high*” e “*low*” para a locomoção central do CA. A linhagem “*high*” possui a locomoção central do CA aumentada quando comparada à linhagem “*low*”. Além de confirmar o efeito desse QTL no CA, esse estudo também sugere que os efeitos do *Anxrr16* ocorram também em machos (MORMEDE et al., 2002). O próximo estudo a confirmar os efeitos do QTL foi o de Vendrusculo et al. (2006), com o uso da F2 das mesmas linhagens (VENDRUSCULO et al., 2006). Da mesma forma que no trabalho original de Ramos et al. (1999) somente em fêmeas foi encontrado o *Anxrr16* afetando a locomoção central do CA (RAMOS et al., 1999). Além disso, esse trabalho sugere que o *locus* também esteja ligado ao consumo de álcool em fêmeas (VENDRUSCULO et al., 2006). Em 2008, Hameister et al. (2008) através do uso de outra linhagem de ratos de laboratório, os Floripa *High* (H) e *Low* (L), sugere que o *Anxrr16* influencie também outras linhagens em relação aos fenótipos relacionados à ansiedade, não somente as derivadas o intercruzamento das linhagens LEW e SHR (HAMEISTER et al., 2008). Três anos mais tarde Izídio et al. (2011), através de uma nova análise de QTL, utilizando uma população F2 proveniente do intercruzamento das linhagens LEW e SHR, confirmou mais uma vez os efeitos do *Anxrr16* em machos e fêmeas e sugere que em fêmeas os efeitos sejam dependentes da fase ciclo estral em que se encontram (IZÍDIO et al., 2011).

Há na literatura mais QTL descritos por pesquisadores independentes relacionados a fenótipos neurobiológicos no cromossomo

4 (MEDEIROS; CORRÊA; CORVINO, 2014) e em especial três próximos à região genômica do *Anxrr16*: dois influenciando o consumo de etanol (BICE et al., 1998; CARR et al., 1998; TEREINIA-RIGALDIE; JONES; MORMEDE, 2003) onde a associação com a emocionalidade foi investigada em ambos os estudos e um para o controle dos níveis de corticosterona endógena (POTENZA et al., 2004). Diante do exposto acima, todos esses trabalhos apontam a importância de se continuar investigando o cromossomo 4 nos estudos envolvendo as bases moleculares da ansiedade, estresse e reatividade emocional (MEDEIROS; CORRÊA; CORVINO, 2014).

1.4 A LINHAGEM CONGÊNICA SLA16

Um dos passos subsequentes à análise de QTL pode ser a criação de uma linhagem congênica intervalo específica (CARR et al., 2006 ; (MOORE; NAGLE, 2000; SAMANAS et al., 2015), onde o tamanho do QTL pode ser reduzido e os genes responsáveis pelo fenótipo mais facilmente localizados (MOORE; NAGLE, 2000).

Os efeitos do QTL *Anxrr16* puderam ser isolados e a sua localização refinada através do desenvolvimento da linhagem congênica nomeada SHR.LEW-*Anxrr16* (abreviada nesse trabalho como SLA16) durante o doutorado da Dra. Elayne Pereira e o mestrado da Msc. Gabriela Ferreira de Medeiros no Laboratório de Genética do Comportamento (LGC). Através dessa metodologia, 86.3 Mpb do cromossomo 4 (*locus* diferencial contendo o QTL *Anxrr16*) da linhagem LEW (doadora) foi transferido através de retrocruzamentos para a linhagem SHR (receptora) (Figura 1). Assim, a linhagem SLA16 contém todos os cromossomos essencialmente iguais à linhagem SHR (usada como seu controle), com exceção do *locus* diferencial presente no cromossomo 4. Essa abordagem permite, através do isolamento desse *locus*, que sejam feitas comparações entre SLA16 e SHR e as diferenças fenotípicas encontradas possivelmente possam ser atribuídas ao *locus* diferencial (FLAHERTY; BOLIVAR, 2006).

Os níveis de emocionalidade da linhagem SLA16, em ambos os sexos, são menores quando os comparados à linhagem SHR (ou seja, sugere-se que sejam menos ansiosos), tanto na locomoção central do CA como em outros testes com parâmetros utilizados para medir a ansiedade/emocionalidade (MEDEIROS; CORRÊA; CORVINO,

2014a). Esse efeito poderia ser esperado devido à natureza contraintuitiva e transgressiva do *locus* diferencial observado previamente. Pensou-se que atividade locomotora desses animais poderia também estar sendo influenciada pelo *Anxrr16*, uma vez que a linhagem SLA16 apresentava maior locomoção geral quando comparada à linhagem SHR. Porém, quando os animais foram testados na caixa de atividade e em suas caixas moradias não houve diferenças significativas na atividade locomotora entre as linhagens (MEDEIROS; CORRÊA; CORVINO, 2014a). Os autores sugerem, através desses resultados, que o *Anxrr16* poderia modular a reatividade emocional das linhagens SLA16 e SHR aos ambientes novos e não à atividade motora espontânea.

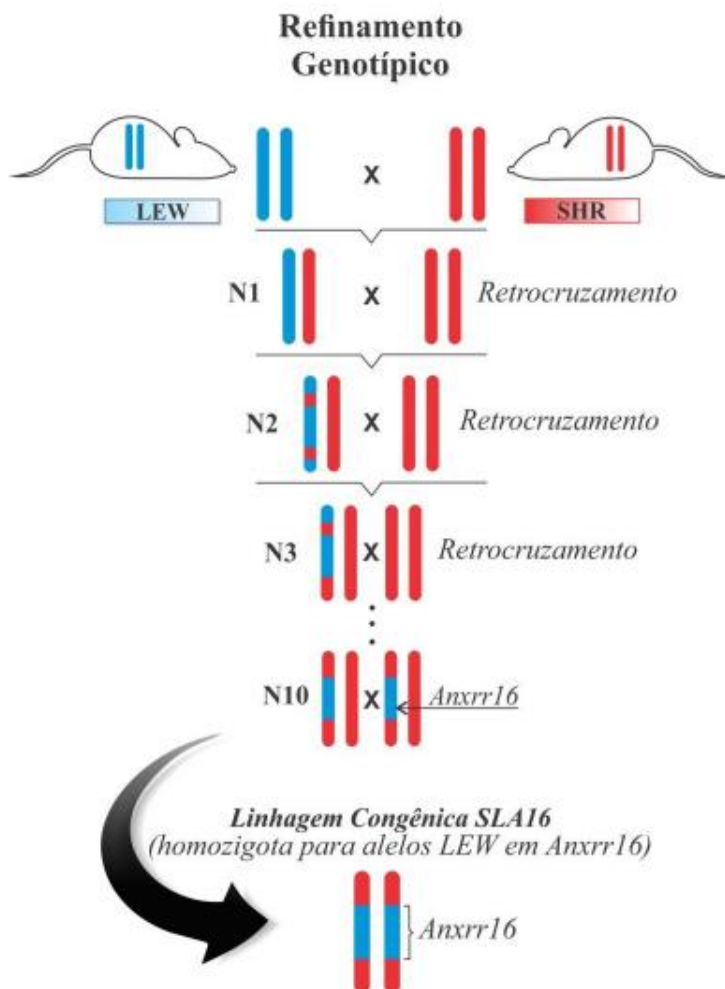


Figura 1– Série de cruzamentos envolvidos na construção da linhagem congênica SLA16. Após a obtenção da N1, os animais gerados foram continuamente retrocruzados com a linhagem parental SHR (e genotipados para marcadores na região do *locus* diferencial) por dez gerações, após as quais os animais heterozigotos no *locus Anxrr16* foram intercruzados. A linhagem congênica é homozigota para os alelos LEW no *locus Anxrr16*, e possui mais de 99,9% de alelos do tipo SHR no restante do seu genoma. Retirado de Côrrea et al. (2015).

1.5 GENE CANDIDATO

Outro passo alternativo, subsequentes às análises de QTL, pode ser a avaliação de genes candidatos. Essa abordagem é uma tentativa de encurtar o caminho entre a análise de QTL e a descoberta dos genes, uma vez que, os genes se encontram na região do QTL e estão relacionados à característica de interesse.

O gene da alfa-sinucleína (*Snca*) codifica para a proteína alfa-sinucleína de 140 aminoácidos amplamente expressa em todo o sistema nervoso central (MORI et al., 2006). Sua função está basicamente ligada à regulação da transmissão da dopamina, através da inibição da enzima tirosina hidroxilase, diminuindo a sua síntese (PENG et al., 2005; PEREZ et al., 2002) e na regulação da recaptção da mesma ao regular a atividade do transportador de dopamina (DAT), diminuindo sua recaptção (WERSINGER; SIDHU, 2003; WERSINGER et al., 2003).

No estudo de Chiavegatto et al. (2009), foi encontrado entre as linhagens LEW e SHR um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*), localizado na região 3' não traduzida do gene da alfa-sinucleína, associado com a locomoção central do CA. Sugere-se que esse SNP poderia levar à expressão diferencial do RNAm da alfa-sinucleína e poderia estar influenciando as diferenças comportamentais relacionadas à ansiedade entre as linhagens usadas no estudo (CHIAVEGATTO et al., 2009).

O *Snca* está localizado no cromossomo 4, dentro da região genômica do *Anxrr16* (próximo ao marcador D4Rat76) e muito próximo ao QTL encontrado no estudo de Côrrea et al. (2015) para a medida “tentativa de escape” (CÔRREA 2015). Assim, desde os promissores resultados encontrados por Chiavegatto et al. (2009), o nosso laboratório aposta no estudo do gene *Snca* como sendo um candidato potencial para possivelmente explicar os efeitos comportamentais do *locus* diferencial.

1.6 INTER-RELAÇÃO ENTRE ANSIEDADE/EMOCIONALIDADE E MEMÓRIA/APRENDIZADO

Willian James foi um dos primeiros pesquisadores que se dedicou aos estudos envolvendo memória e emocionalidade (JAMES, 1890). Em seguida, no início dos anos 90, um modelo proposto pelos pesquisadores

Robert M. Yerkes e John Dodson Dillingham, conhecido como curva de Yerkes-Dodson propõe que a ansiedade e o estresse poderiam modular a memória (YERKES; DODSON, 1908). Esse modelo na forma de U invertido tem sido estudado até hoje (CHABY et al., 2015). Um dos maiores pesquisadores brasileiros dentro do campo de estudos da memória, Iván Izquierdo, também dedica um capítulo em seu livro “Memória” exclusivamente para discorrer sobre como a emocionalidade (nível de ansiedade, de ânimo e estado de alerta) pode modular a memória (IZQUIERDO, 2011).

Um exemplo dessa inter- relação que já vem sendo estudada na literatura é a amígdala basolateral. Roozendaal e colaboradores (2002) estudaram os efeitos dos glicocorticoides sobre a amígdala basolateral e concluíram que quando os mesmos eram injetados na fase de consolidação sugere-se uma melhora nessa fase da memória, ao passo que, a recuperação da memória parece ser prejudicada com os glicocorticoides circulantes (ROOZENDAAL, 2002). Os efeitos dos glicocorticóides sobre a amígdala basolateral e como isso influencia a memória ainda é considerado controverso, uma vez que, parecem ser dose-dependentes e dependem grande parte das vezes das diferentes fases da memória (aquisição, consolidação e recuperação) que estão modulando (JOELS; FERNANDEZ; ROOZENDAAL, 2011; ROOZENDAAL, 2002). Essa estrutura responde aos hormônios circulantes (como glicocorticoides, por exemplo) que afetam o seu desempenho ao mesmo tempo em que ela modula outras áreas relacionadas à memória como o hipocampo e o estriado, influenciando-as no desempenho cognitivo (IZQUIERDO, 2011; JOELS; FERNANDEZ; ROOZENDAAL, 2011; ROOZENDAAL, 2000, 2002)

Schwabe e colaboradores também sugerem que o estresse poderia modular o hipocampo e o estriado, além da amígdala, também envolvidos no controle da memória/aprendizado (SCHWABE, WOLF, 2012). A literatura relaciona essas duas estruturas essencialmente a dois tipos de memória: a memória declarativa e a de procedimento ou hábito, associadas ao controle do hipocampo e estriado, respectivamente (ROSSATO et al.; 2006). No estudo de Schwabe e colaboradores, utilizando ressonância magnética, observou-se que o estresse possivelmente induzia mudanças nos sistemas neurais favorecendo mais a memória procedural estriado-dependente do que a declarativa hipocampo-dependente. Outros estudos ainda relacionaram o volume dessas estruturas com a depressão, porém mais estudos precisam ainda

avaliar melhor este ponto (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Assim, como base no que foi apresentado acima, há na literatura diversos pesquisadores de alguma forma vêm estudando a ligação entre a ansiedade/emocionalidade e a memória/aprendizado, especialmente no que diz respeito às estruturas cerebrais que estariam envolvidas como: córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, estruturas escolhidas para serem investigadas no presente trabalho (CAMPBELL et al., 2004; DANNLOWSKI et al., 2012; IRLE et al., 2010; KHEIRBEK et al., 2013).

1.7 IMPORTÂNCIA DE ESTUDAR FÊMEAS

Institutos de pesquisa e pesquisadores do mundo todo vêm atentando para a inclusão de fêmeas nas pesquisas biomédicas (BEERY; ZUCKER, 2011; HAYDEN, 2010; SIMPSON; KELLY, 2012; WALD; WU, 2009). Um estudo envolvendo cinco grandes revistas (*Behavioural Brain Research*, *Behavioural Pharmacology*, *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, *Physiology and Behaviour* e *Psychopharmacology*) revelou que apenas 17% dos trabalhos eram realizados exclusivamente com fêmeas. Em contrapartida, 72% utilizaram somente machos e 11% incluíam ambos os sexos (SIMPSON; KELLY, 2012). Diferenças significativas são encontradas entre machos e fêmeas, tanto em animais humanos e não humanos, em grande parte dos ensaios pré-clínicos e clínicos (SIMPSON; KELLY, 2012). Além disso, grande parte dos transtornos neuropsiquiátricos (especialmente a ansiedade) é observada em fêmeas (HAYDEN, 2010) e alguns resultados encontrados em machos não são aplicáveis às fêmeas (SORGE et al., 2015).

A preferência pelo uso de machos nas pesquisas biomédicas normalmente se dá devido às flutuações hormonais encontradas em fêmeas, onde o ciclo estral das ratas dura em média 4-5 dias e é composto de quatro fases (BEERY; ZUCKER, 2011; SIMPSON; KELLY, 2012). Essa variabilidade nas fases do ciclo estral demanda mais tempo de trabalho por parte dos experimentadores para acompanhá-las, além disso, sugere-se que seja necessário o uso de até quatro vezes mais fêmeas do que de machos para garantir que elas estejam em sincronia nas fases do ciclo estral (WALD; WU, 2009).

A despeito do que é encontrado na literatura relacionando às fases do ciclo estral e os testes comportamentais (IZÍDIO et al., 2011;

SIMPSON; KELLY, 2012), o presente trabalho não avaliou as fases do ciclo estral nas fêmeas estudadas. Uma vez que, o presente grupo de pesquisa já investigou essa relação e, aparentente, nas linhagens que foram estudadas, não houve diferenças significativas em relação à fase do ciclo estral que as fêmeas encontravam-se e a emocionalidade (DIAS, 2015; DE MEDEIROS et al., 2013).

Recentemente, o renomado instituto de pesquisa NIH (*National Institutes of Health*), com a finalidade de incentivar o uso de pesquisas pré-clínicas envolvendo fêmeas, anunciou a obrigatoriedade da inclusão desse sexo nas submissões de projetos que visem bolsas de financiamento, salvo “forte justificativa” pelo uso unicamente de machos (NIH, 2015). Assim, atentando para o que foi exposto acima, o presente trabalho é desenvolvido na sua totalidade utilizando fêmeas.

2 HIPÓTESES

Com base no que foi exposto anteriormente três hipóteses foram formuladas:

1. Existem QTL no cromossomo 4 que influenciam medidas comportamentais relacionadas à ansiedade/emocionalidade e/ou memória/aprendizado (além das já descritas na literatura), bem como, as variáveis destes diferentes testes comportamentais apresentam uma relação significativa.
2. Há diferenças comportamentais entre as fêmeas das linhagens SLA16 e SHR nos testes utilizados para avaliar ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado.
3. O gene da alfa-sinucleína está diferencialmente expresso em fêmeas das linhagens SLA16 e SHR.

3 OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL

Buscar regiões genômicas no cromossomo 4 das fêmeas, que estejam envolvidas no controle da ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado, bem como melhor compreender a relação entre os testes comportamentais, que envolvam estes componentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Realizar uma análise de QTL e uma análise de fator com testes comportamentais relacionados à ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado;
2. Confirmar, nas fêmeas das linhagens SLA16 e SHR, os QTL encontrados na presente análise de QTL;
3. Avaliar a expressão do gene *Snca* no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado das fêmeas das linhagens SLA16 e SHR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Primeira estratégia experimental

4.1 ANIMAIS

O Laboratório de Genética do Comportamento (LGC, UFSC) adquiriu a linhagem LEW/HsdUnibAnra a partir da UNICAMP (Campinas, SP, Brasil), obtida da Sprague Dawley Inc. (Indianápolis, IN). Ao passo que, a linhagem SHR/NCrIAnra foi adquirida da UNESP (Botucatu, SP, Brasil) e é originária de Harvard (Boston, MA).

Com o intuito de manter a isogenicidade das linhagens as colônias de ratos LEW e SHR foram submetidas desde a sua aquisição ao acasalamento consanguíneo (irmão/irmã). Com quatro semanas de idade ocorreu o desmame dos animais e sexagem. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com cinco/animais em casa uma. Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*, sob um ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acessas às 07:00 h) com a temperatura sempre mantida à 21 ± 2 °C.

A geração F2 (necessária para análise de QTL) foi gerada através do cruzamento dessas duas linhagens. Todos os experimentos aqui apresentados estavam de acordo com as normas locais do Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) e do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN), aprovados sob os Protocolos PP00903 e 040/2011, respectivamente.

4.2 PRODUÇÃO DOS ANIMAIS F2

Para a produção dos animais utilizados neste trabalho, por questões logísticas, foram necessárias duas levas de acasalamento, realizadas em momentos distintos (denominadas aqui de primeiro e segundo grupo).

Para a produção do **primeiro grupo**, 5 ratos SHR machos e 5 LEW fêmeas foram cruzados, gerando uma população híbrida F1. Os animais F1 foram intercruzados (15 machos x 15 fêmeas), produzindo 59 fêmeas F2 (primeiro grupo), no Laboratório de Estudos da Memória em Roedores

(LEME-UFRN). Os ratos F2 do primeiro grupo foram submetidos a uma bateria de 5 testes comportamentais (na mesma ordem descrita no item 4.3 Fenotipagem), a partir de 8 semanas de idade.

Posteriormente, 15 machos e 15 fêmeas F1 foram novamente inter cruzados, produzindo mais 39 fêmeas F2 (**segundo grupo**). O segundo grupo também foi submetido à mesma bateria (e mesma ordem) de testes comportamentais que os animais do primeiro grupo.

Após os testes comportamentais (**fenotipagem**), todos os animais foram sacrificados e amostras de tecidos foram retiradas de cada animal para extração e análise de DNA (**genotipagem**).

Neste trabalho foram utilizadas 96 ratas da geração F2 para as análises fenotípicas e genotípicas, sendo que os testes comportamentais envolvendo a geração F2 foram realizados no LEME-UFRN.

4.3 FENOTIPAGEM

4.3.1 Labirinto em Cruz Elevado Modificado

Proposto no ano 2000 por Silva e Frussa-Filho (2000), o labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM) é um aparato de estudo de memória e aprendizado com o diferencial de fornecer ainda informações sobre o estado emocional do animal (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000). O LCEM utilizado possuía quatro braços de madeira, dispostos em formato de cruz. Dois dos braços eram abertos (comprimento= 50 x largura= 15 cm) opostos a dois braços fechados de mesmo comprimento e largura e 40 cm de altura, elevados cerca de 50 cm do chão (**Figura 2**). Um dos braços fechados (braço aversivo) possuía uma lâmpada de 100W e uma fonte sonora acopladas na extremidade final superior que, quando acionadas, tornavam esse braço aversivo para o animal. A lâmpada acionada gerava uma iluminação de aproximadamente: 1200 lux no início do braço aversivo; 2000 na metade (embaixo da lâmpada) e 1500 no final. Já a fonte sonora emitia um ruído de 80 dB quando ativada. Os braços abertos possuíam uma pequena borda com o intuito de prevenir uma possível queda do animal.

Este protocolo consistiu em duas sessões: uma sessão de treino e uma de teste. Na sessão de treino, cada animal foi colocado no aparato experimental e pôde explorá-lo livremente por 10 minutos. Cada vez que o animal entrava com as quatro patas no braço considerado aversivo, o

experimentador acionava os estímulos aversivos (ruído de 80 dB emitido pela caixa de som e luminosidade emitida pela lâmpada) por meio do filtro de linha, interrompendo-os assim que o animal deixava esse braço com as quatro patas. Quando o animal adentrava com as quatro patas o outro braço fechado (braço não-aversivo), ou nos braços abertos, nenhum estímulo era acionado.

Após 24h da sessão de treino, ocorreu a sessão de teste. Os animais foram reexpostos ao mesmo aparato pelo mesmo tempo (10 minutos), mas nenhum estímulo aplicado. Entretanto, a caixa de som e a lâmpada permaneceram sobre o braço aversivo (desligadas) como pistas ambientais para o animal. O tempo de permanência nos braços abertos, no centro da plataforma e em cada braço fechado (aversivo e não-aversivo) foi registrado a cada minuto durante ambas as sessões. O tempo de exploração dos braços aversivos foi aferido minuto a minuto, com o intuito de avaliar a retenção e extinção da tarefa (minutos finais). A retenção da tarefa (aprendizado) foi avaliada pela porcentagem de tempo de exploração do braço aversivo (tempo gasto no braço aversivo/tempo gasto em ambos os braços fechados – aversivo e não-aversivo) na sessão de teste. Ao mesmo tempo, a porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos (tempo gasto nos braços abertos/tempo gasto em todos os braços), aos quais roedores exibem uma esquia inata, foi utilizada para avaliação da emocionalidade. Além disso, a distância percorrida no labirinto também foi registrada e utilizada para avaliação da atividade motora. As sessões foram gravadas por uma câmera digital posicionada acima do aparato e o registro dos parâmetros comportamentais supracitados foi realizado pelo software Anymaze® (Stoelting, USA).



Figura 2 - Aparato utilizado no teste do LCEM.

4.3.2 Campo Aberto

Desenvolvido originalmente nos anos trinta por Calvin Hall (1934) com a finalidade de medir a emocionalidade em ratos, o Campo Aberto (CA) é um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados atualmente (HALL, 1934). Comportamentos relacionados à ansiedade são observados naturalmente em roedores ao serem expostos a ambientes novos, abertos e iluminados. De acordo com o interesse da pesquisa variações no tamanho, forma da arena e intensidade da iluminação do CA podem ser aplicadas (EILAM, 2003; WALKER; DAVIS, 1997).

Para realização desse teste, utilizou-se uma arena preta circular (diâmetro de 84 cm), cercada por paredes de 32 cm de altura (**Figura 3**), com o chão do aparato dividido por linhas, sendo que a região adjacente à parede constituía a região periférica, enquanto a região central era localizada na região interna do aparato. Cada animal foi posicionado no centro do aparato e o número de quadrados cruzados na região periférica e central foi registrado ao longo de cinco minutos. Além disso,

quantificou-se também o tempo gasto na região central no aparato. A literatura considera que a locomoção na área central do aparato está mais relacionada com a emocionalidade do animal, enquanto a locomoção periférica envolveria predominantemente o componente motor (RAMOS et al., 2008). Pistas externas (figuras geométricas) foram colocadas nas paredes para facilitar a localização espacial dos animais nesse teste.



Figura 3- Aparato utilizado no teste do CA.

4.3.3 Reconhecimento de Objetos

O teste de Reconhecimento de Objetos (RO) (**Figura 4**) foi utilizado pela primeira vez em 1988 por Ennaceur e Delacour (ENNACEUR; DELACOUR, 1988) e avalia a exploração natural de objetos novos em um ambiente familiar pelos animais (ANTUNES; BIALA, 2012), onde normalmente os ratos dispõem a maior parte do tempo explorando o objeto novo em detrimento do já apresentado (familiar) (DODART et al., 1997; (OBINU et al., 2002). Ou seja, é baseado essencialmente no comportamento exploratório inato dos roedores e o principal tipo de memória avaliada são as memórias declarativas episódicas. A grande vantagem desse teste quando comparados aos outros da mesma natureza é a de não requer motivação externa, recompensa ou punição ao longo do seu desenvolvimento.

Dois objetos diferentes foram usados aleatoriamente entre os experimentos (taças ou xícaras). Os objetos diferiam em altura e largura, foram feitos de plástico e preenchidos com cimento para garantir que os animais não os deslocariam durante o experimento. O protocolo consistiu em uma sessão de treino e uma de teste. Vinte e quatro horas após a habituação no teste do CA (item 4.3.2), cada animal foi situado no centro do aparato com duas cópias idênticas de um dos objetos (sessão de treino), em uma configuração espacial específica. Após 24h, cada animal foi reexposto ao aparato com uma cópia do objeto familiar (objeto idêntico ao treino) e uma cópia do objeto novo (consistindo na sessão de teste). O tempo de exploração do objeto novo (Tn) e do objeto familiar (Tf) foi contabilizado na sessão de teste. Com o tempo gasto em cada objeto calculou-se o índice de discriminação (DI) – $DI = (Tn - Tf) / (Tn + Tf)$. Esse resultado pode variar de +1 a -1, no qual o resultado positivo indica mais tempo gasto com o objeto novo, o resultado negativo indica mais tempo gasto com o objeto familiar e o resultado zero, nenhuma preferência (AGGLETON; ALBASSER; AGGLETON, 2010; BURKE et al., 2010). Considera-se que o animal aprendeu a tarefa quando ele explora mais tempo o objeto novo em detrimento do familiar.

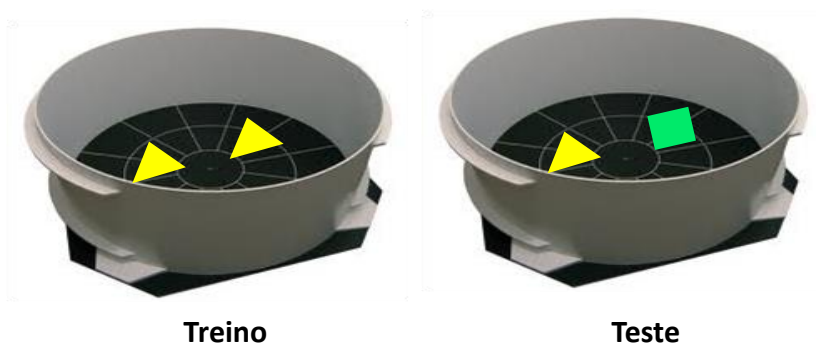


Figura 4 – Esquema utilizado no teste do RO. As figuras geométricas representam os objetos idênticos na sessão de treino. Na sessão de teste está representado o objeto familiar e o novo.

4.3.4 Alternação Espontânea

O teste de Alternação Espontânea (AE) foi descrito em 1925 por Tolman e colaboradores (TOLMAN, 1925). Esse teste também não utiliza estímulos aversivos no seu desenvolvimento e avalia as diferenças de desempenho dos animais quanto à memória espacial (RIBEIRO et al., 2010).

Nesse experimento, cada animal foi submetido a uma sessão de 10 minutos em um labirinto em cruz elevado (**Figura 5**) feito de madeira, com quatro braços fechados idênticos (50 x 15 x 40 cm de altura) identificados como braços A, B, C e D. Pistas externas foram colocadas nas paredes para que o animal pudesse se localizar espacialmente. Quando deixados para explorar livremente, ratos alternam espontaneamente entre os braços do labirinto, utilizando a memória espacial de trabalho para reter as informações dos braços previamente visitados. A sequência de entradas nos braços foi registrada e a porcentagem de alternação espontânea foi utilizada para análise do comportamento. Uma alternação é definida como a entrada em todos os quatro braços consecutivamente, sem repetições, e o percentual de alternações será calculado como o total de alternações/máximo de alternações possíveis.



Figura 5 – Aparato semelhante ao utilizado no teste de AE.

4.3.5 Medo Condicionado

O teste do Medo Condicionado Contextual (MC) (**Figura 6**) aqui realizado, idêntico ao descrito por Ribeiro et al. (2010), é utilizado com a finalidade de investigar a memória emocional dos animais e baseado no condicionamento Pavloviano. A idéia desse teste foi descrita pela primeira vez em 1970 por Bolles e colaboradores (BOLLES, 1970). Brevemente, o contexto em que o animal se encontra é considerado o estímulo neutro e o choque nas patas o estímulo incondicionado aversivo. Posteriormente, transforma-se o estímulo neutro em condicionado aversivo e respostas de medo condicionadas (como o congelamento contextual) são apresentadas pelos animais somente com a exposição dos mesmos ao estímulo neutro (FENDT; FANSELOW, 1999).

Nesse protocolo os animais foram submetidos a duas sessões de 5 minutos (sessão de treino e teste), em uma caixa com chão de grade de compartimento único. Na primeira sessão (treino), cada animal foi colocado no aparato e após 150 s, seis choques de 0.4 mA foram administrados por 2s a cada 30s. Nessa sessão de treino duas fases foram consideradas: antes (pré-condicionamento) e durante (condicionamento) a administração dos choques. Após o último choque, os ratos retornaram para suas casas moradias. Na sessão de teste (após 24 h) não foram aplicados choques. Foi quantificada a duração do comportamento de congelamento (*freezing*) e a tentativa de escape (*jumping* e *rearing*) durante todas as fases (pré-condicionamento, condicionamento e teste).



Figura 6 – Aparato utilizado no teste do MC.

4.4 ANÁLISE DE FATOR

Uma análise de fator (com *eigenvalue* mínimo igual a 1) foi realizada com os resultados da fenotipagem dos animais F2. Através dessa metodologia, as variáveis reais utilizadas nos testes comportamentais aqui desenvolvidos são agrupadas de uma forma mais simples em variáveis virtuais, que se correlacionam, denominadas fatores. A estimativa da correlação é expressa por um coeficiente que varia de -1 a +1, onde cargas iguais correlacionam os resultados positivamente e cargas opostas negativamente.

Através da análise de fator na parte comportamental, variáveis que aparentemente poderiam não ter nada a ver uma com a outra (independentes) ao se correlacionarem essencialmente explicam coisas semelhantes em testes distintos.

Assim, a análise de fator é usada para distinguir as diversas dimensões de reatividade emocional em modelos experimentais (MORMEDE et al., 2002). Todos os procedimentos da análise estatística foram realizados com o uso do programa *Statistica 10*.

4.5 GENOTIPAGEM

Foram utilizados 10 marcadores moleculares do tipo microssatélite, polimórficos entre as linhagens parentais, escolhidos por se distribuírem ao longo de todo o cromossomo e se localizarem nas regiões onde tinham sido encontrados QTL prévios relacionados a características neurobiológicas (BICE et al., 1998; CARR et al., 1998; POTENZA et al., 2004; RAMOS et al., 1999; TERENINA-RIGALDIE; JONES; MORMEDE, 2003). Após a análise comportamental (fenotipagem), cada um dos animais foi então genotipado para estes 10 marcadores do tipo microssatélite (**Quadro 1**). As amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) foram extraídas de pequenos fragmentos tissulares do fígado (de aproximadamente 1 cm) dos animais F2. Para extração do DNA, utilizou-se o kit comercial DNAzol (GibcoBRL), permanecendo estocado em freezer -20 °C até o momento do uso. Após a extração, 5 uL das amostras de DNA (concentração de 10 ng/uL) foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), com 5 uL de mix de cada par de *primers* (1 pmol/mL de cada), 0,4 u de GoTaq® DNA Polymerase, 10 uL de tampão 2x (Promega), em um volume total de 20 uL. A amplificação foi realizada em um termociclador Px2 Thermo Cyclor (Hybaid, EUA) com a seguinte programação: (a) um ciclo a 96 °C por 5 minutos; (b) trinta e cinco ciclos a 92 °C por 30 segundos, 51-59 °C (dependendo do microssatélite utilizado) por 1 minuto e 72 °C por 31 segundos; e (c) um ciclo a 72 °C por 2 minutos. Em seguida ao processo de amplificação, o produto de PCR dos animais F2 foi misturado com corante não mutagênico Kasvi® e aplicado – juntamente com amostras controle de animais LEW, SHR e F1 – em géis de agarose a 3%. A genotipagem para cada marcador microssatélite foi analisada comparando-se a posição das bandas de cada amostra com as dos respectivos controles.

Quadro 1- Marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados na genotipagem dos animais F2. Na primeira coluna está o nome de cada marcador. Na segunda coluna encontram-se a posição do marcador em pares de base no cromossomo 4 (de acordo com o mapa *RGSC Genome Assembly v3.4*). Na terceira, as sequências dos seus primers *forward* (F) e *reverse* (R) e na quarta coluna, os tamanhos esperados para os alelos nas linhagens LEW e SHR (com base em dados das sub-linhagens LEW/Pit e SHR/OlaHSd, respectivamente). Todas as informações foram obtidas por meio do *Rat Genome Database Website* (2014).

Marcador	Posição (pb)	Sequências dos <i>Primers Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)	Tamanhos esperados (pb)	
			LEW	SHR
D4MGH22	4.410.369	F: CCTGTCATGTTATTGATGATGATG R: GGTCACATGAAATTTGACCTCA	92	114
D4RAT151	29.413.686	F: TCAAAGGGTAGATGATGGAGTTT R: GGTGCAAATTCAGAGGCATT	238	224
D4WOX22	78.042.681	F: TCAGAAAAATTTAAATTGTATCTG TG R: CCATATGCAAGTGTGGGTATC	Não disponível (aprox. 162 pb)	
D4RAT76	84.886.545	F: GTTAAGGAACCATGGGCTGA R: GTTAAGGAACCATGGGCTGA	176	200
D4RAT49	119.279.962	F: CAGGGAGCTACTGCACACCT R: TCCATCCCTTCACAGACTTTG	151	157
D4MGH27	129.308.765	F: TCCTTCACATACATGTGCATACC R: TGAGAAGGGCTGTCAGTGG	258	252
D4MGH6	135.636.930	F: GGGTCTTGTAGCATTTTTTAAAGC R: AGAACCAACTCCTAAACTCCTGC	154	142
D4RAT59	150.047.799	F: GCGGAATGATAGTTACTACGGC R: GCAGTGTGTTTGGGGTAGCT	168	174
D4MGH11	171.204.377	F: CTCAACGAACAGGTTTCATTATG R: AGAAGGGATGACAATTGGTACG	150	158
D4RAT206	Não disponível	F: GCAGGAAACAGTTTACTTCATGC R: AAGTAGTTGGCATGCGTGTG	160	170

4.5.1 Gel de agarose

Para a genotipagem dos animais foi utilizado gel de agarose 3% (7g de agarose dissolvidas em 250 mL de tampão TBE 0,5X (Tris, Boro e EDTA). A mistura foi levada ao forno micro-ondas e aquecida até a total dissolução do pó. O gel foi então depositado no recipiente apropriado por aproximadamente 20 minutos para ocorrer a solidificação do gel. Em seguida, o gel sólido foi colocado em uma cuba de eletroforese e coberto com cerca de 700 mL de tampão TBE 0,5X. Depositou-se 7 μ L do produto de PCR e 1,5 μ L do corante Kasvi® (Alaranjado G, Azul de Bromofenol e Xileno Cianol) em cada poço (no máximo 42 amostras por gel) que foram submetidos a uma corrente elétrica variante e tensão fixa de 300V durante 40-70 minutos, variando de acordo com o marcador molecular utilizado.

4.6 ANÁLISE DE QTL

Para proceder à análise de QTL, os dados genotípicos e fenotípicos das 96 ratas da geração F2 foram adicionados ao software estatístico R e analisados por meio do pacote R/QTL, sendo que os gráficos provenientes das análises foram gerados pelo J/QTL, que é uma interface gráfica de análise de dados. Antes de proceder à análise de QTL, faz-se necessário a construção de um mapa de ligação que fornece a localização e a distância em frequência de recombinação ou centimorgans (cM) entre todos os marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados. Essa distância é calculada a partir da taxa de recombinação que ocorre entre esses marcadores e foi realizada por meio do programa QMOL.

O mapa de genético de ligação exibido na **Figura 7** tem um total de 149.08 cM, gerado a partir da análise de ligação com os dados genotípicos obtidos dos 10 marcadores moleculares e as 96 fêmeas que compunham a população F2 desse estudo. Todos os 10 marcadores moleculares alinharam corretamente no mapa genético.

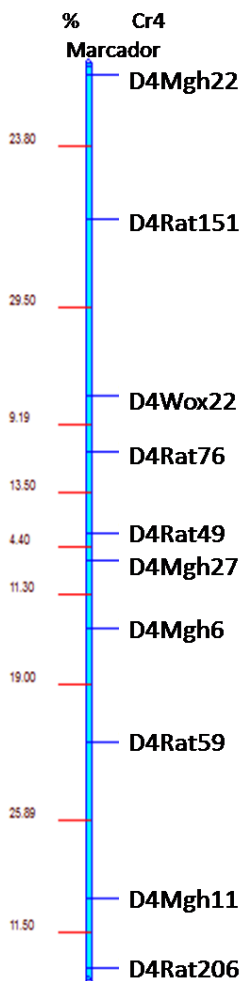


Figura 7 – Mapa genético originado a partir dos dados genotípicos obtidos com os 10 marcadores moleculares utilizados em todos os animais da população F2 desse estudo. A barra vertical azul representa o cromossomo 4 onde estão demonstradas as posições de cada marcador molecular utilizado. As distâncias entre eles estão representadas em centimorgans (cM) do lado esquerdo da figura, enquanto que os nomes dos marcadores estão do lado direito da mesma. Cr= cromossomo

O passo subsequente ao mapa de ligação é a adição desses dados, juntamente com os fenotípicos, ao programa R/QTL. O programa R/QTL foi utilizado para realizar o mapeamento do QTL.

A análise de ligação procurou por um QTL ao longo de todo cromossomo a cada 1 cM, gerando um LOD score (logaritmo de *odds*) como medida de significância do QTL. A pontuação de LOD score compara a probabilidade de existir um QTL, em um determinado intervalo, com a probabilidade de não existir nenhum QTL em qualquer lugar em todo cromossomo, sendo que quanto maior o valor do LOD, maior a probabilidade de que a região genômica em questão afete o fenótipo de interesse.

No presente estudo, os limiares (*threshold*) de significância ($p < 0,05$) e sugestividade ($p < 0,10$ altamente sugestivo e $p < 0,63$ sugestivo) foram estimados por meio do teste de permutação para cada fenótipo, com a análise de 1000 permutações a cada 1 cM. Esses limiares de significância foram escolhidos porque são os pontos de corte (*cutoff*) amplamente aceitos (LANDER; KRUGLYAK, 1995) e foram calculados utilizando 1000 permutações (CHURCHILL; DOERGE, 1994). O teste de permutação é uma abordagem mais geral para obter valores limiares de significância que são ajustados a cada caso. Foi utilizado o mapeamento por intervalo composto, que consiste no método mais utilizado para análise de QTL, o qual leva em conta dados genotípicos faltantes em um QTL putativo. O mapeamento por intervalo composto permite testar se há evidência da presença de QTL em todas as posições do genoma. Além disso, o efeito do QTL também foi estimado considerando o grupo (**primeiro** e **segundo grupo**) da população F2, ver item 4.2) como uma covariável interativa, já que a época do nascimento (variável ambiental) pode afetar de modo diferente o comportamento dos animais. A principal vantagem de se incluir covariáveis na análise de QTL é melhorar a capacidade de detecção do QTL, no caso de a covariável ter um forte efeito sobre o fenótipo.

Segunda estratégia experimental

4.7 ANIMAIS

Na segunda estratégia experimental utilizou-se 12 fêmeas da linhagem SHR e 12 fêmeas da linhagem congênica SLA16, com 8 semanas de idade. Como já comentado, a SLA16 foi desenvolvida integralmente no LGC-UFSC e possuem em especial uma região de interesse (*locus* diferencial), transferida do genoma de uma das linhagens parentais (doadora) para a outra linhagem (receptora), através de sucessivos retrocruzamentos (**Figura 1**). Com isso as diferenças

comportamentais encontradas entre as linhagens SHR e SLA16 podem ser atribuídas ao *locus* diferencial.

Essa etapa foi realizada utilizando fêmeas SLA16 e SHR controle, sendo todos os experimentos realizados no LGC-UFSC (CEUA/UFSC Protocolo PP00903).

4.8 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

4.8.1 Labirinto em Cruz Elevado Modificado

Para realização desse teste, os mesmos parâmetros comportamentais descritos no item 4.3.1 foram avaliados. Todavia, o comportamento foi analisado por meio de câmera de vídeo situada acima do aparato, onde os registros foram captados na sala adjacente à sala de teste comportamental e analisados por um experimentador.

4.8.2 Campo Aberto

O teste do CA foi realizado em uma arena branca (**Figura 8**) quadrada (100 x 100 cm), cercada por paredes de 40 cm de altura, com o chão dividido por linhas pretas em 25 quadrados (20 x 20 cm). Os 16 quadrados adjacentes às paredes formavam a região periférica do aparato, enquanto os outros nove estabeleciam a parte central. A iluminação do teste foi feita através da lâmpada da sala de testes, controlada por um *dimmer*, sendo fixada em 10 lux. Cada animal foi posicionado no centro do aparato e os mesmos parâmetros comportamentais descritos no item 4.3.2 foram registrados (locomção central, locomoção periférica e tempo gasto no centro do aparato).



Figura 8 – Aparato utilizado no teste do CA.

4.8.3 Reconhecimento de Objetos

Para realização desse teste comportamental, o protocolo foi exatamente o mesmo descrito no item 4.3.3, diferindo apenas na estrutura do CA, que foi circular no experimento com os animais F2 e quadrado nesse caso, conforme descrito no tópico 4.3.2.

4.8.4 Alternação Espontânea

Nesse experimento, foi utilizado um aparato branco de madeira (**Figura 9**) formado por quatro braços (60 x 10 x 20 cm de altura), sendo que um dos braços foi fechado. Os braços foram identificados como braço A, B, C e elevados a 70 cm do chão. A sequência de entradas nos braços foi registrada e a porcentagem de alternação espontânea foi utilizada para análise do comportamento. Uma alternação é definida como a entrada em todos os três braços consecutivamente, sem repetições, e o percentual de alternações será calculado como o total de alternações/máximo de alternações possíveis.



Figura 9 – Aparato utilizado no teste de AE.

4.8.5 Medo Condicionado

A realização desse teste seguiu exatamente o mesmo protocolo descrito anteriormente (item 4.3.5). As medidas comportamentais aferidas foram o tempo de congelamento e tentativa de escape do animal nas sessões de treino e teste, consideradas como medidas de retenção da tarefa, como já anteriormente detalhada.

Terceira estratégia experimental

A terceira estratégia experimental desse trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.9 EXPRESSÃO GÊNICA

4.9.1 Material biológico para análise de expressão gênica

Nessa etapa, 10 fêmeas *naive* das linhagens SHR e SLA16 (5/linhagem), com 8 semanas de idade foram sacrificadas utilizando Isuflorano (Cristália, São Paulo), as estruturas de interesse: hipocampo, córtex pré-frontal e estriado (por serem relacionadas com a ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado) retiradas, imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para *freezer* -80 °C.

4.9.2 Extração de RNA

O RNA das amostras de tecido foram extraídos utilizando o método Trizol Reagent (Invitrogen, São Paulo, Brasil), segundo o protocolo descrito pelo fabricante Carvalho et al. (2015). A quantificação do RNA total foi feita no equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Todas as amostras apresentaram razões de 260/230 nm e 260/280 nm maiores ou iguais a 1,8.

4.9.3 Preparação dos primers para Real time-PCR

Os *primers sense* e *antisense*, específicos para o gene avaliado (*Snca*) foi desenhado com o auxílio do *Primer3 Software*, a partir do estudo da sequência conservada de cDNA desse gene, disponível no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). O mesmo procedimento se aplicou para os genes normalizadores (*Gapdh* e *Ppia*). Os *primers* foram selecionados pelo tamanho (18-22 nucleotídeos), conteúdo de G/C (Guanina/Citosina) ao redor de 50%, desenhados em diferentes éxons, quando possível, para evitar contaminação com DNA genômico, temperatura de anelamento entre 58-60°C, tamanho do amplicon entre 50-150 nucleotídeos com maior proximidade da terminação 3' e especificidade utilizando-se a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A relação completa dos iniciadores utilizados pode ser consultada no **Quadro 2**.

Quadro 2- Sequência de *primers* utilizados para PCR em tempo real. Genes normalizadores (*Gapdh* e *Ppia*) e de interesse (*Snca*). As sequências estão representadas de 5'>3'.

Genes	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
<i>Gapdh</i>	AGGAGCGAGACCCCACTAAC	GTGGTTCACACCCATCACAA
<i>Ppia</i>	AATGCTGGACCAAACACAAA	CCTTCTTTCACCTTCCCAAA
<i>Snca</i>	GAGGGAGTCGTTTCATGGAGT -	CATTTGTCACCTTGCTCTTTG G

4.9.4 Síntese do cDNA

A síntese de cDNA e PCR em tempo real, foram feitas de acordo com os protocolos utilizados por Carvalho et al. (2015).

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foram usados 60 ng de RNA total em um volume final de 20 µL. Inicialmente em um microtubo de reação foram adicionados: água Ultrapure (Quiagen), os 600 ng de RNA e 2 µL de oligo (dT20), o volume de água é dependente da concentração da amostra. Ao final desse procedimento o microtubo deve contendo 12,5 µL foi aquecido a 65 °C por 5 minutos e depois colocado em gelo para parar a dissociação das moléculas e sua permanência em fita simples. Em seguida foram adicionados ao microtubo de reação 2 µL de dNTP mix, 4 µL de Reaction Buffer 5X (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL de Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) e 1 µL da enzima RivertAID Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), totalizando o volume final de 20 µL. As amostras foram transferidas para o termociclador Peltier Thermal Cycler (Biocycler) com programação de 50 °C por 30 minutos e 85 °C por 5 minutos, conforme instruções do fabricante. O cDNA obtido foi estocado a - 20 °C.

4.9.5 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento CFX 96TM Real Time System (BioRad). Foi feita uma curva de diluição em 5 concentrações (20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng e 1,25 ng) para cada gene analisado, sendo as reações pipetadas em triplicata para a curva e em duplicata para os demais procedimentos. A eficiência das reações foi calculada pelo programa Bio-Rad CFX Manager (BioRad) e o valor aceitável foi estipulado entre o intervalo de 95-105% (diferença de no máximo 10% entre genes alvos e seus controles endógenos). Em todas as reações foi utilizado 10 µL de SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil), 1 µL de cDNA (10 ng), 0,4 µL de cada *primer* (*forward e reverse*) e 8,2 µL de água ultrapura. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo (NTC) e o volume final foi mantido em 20 µL. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto com adicional da curva de dissociação (curva de *melting*). As curvas de dissociação foram analisadas e não foi encontrado nenhum produto impuro, ou dímeros de *primers*.

4.9.6 Normalização dos dados de PCR em tempo real

Foram utilizados dois genes de referência (*Gapdh* – gliceroldeído-3-fosfatodehidrogenase e *Ppia* – peptidilprolil isomerase A) para normalizar os níveis de mRNA dos genes selecionados. Esses genes foram selecionados com base na estabilidade (menor variabilidade) e no nível de transcrição que apresentam no sistema nervoso central. Os ciclos limite ou *quantification cycle* (Cq) foram exportados para uma planilha do Excel e a quantidade relativa dos transcritos foi calculada conforme (VANDESOMPELE et al., 2002). Nesse cálculo, a média aritmética das réplicas é transformada em quantidade relativa da amostra considerando a eficiência da curva de diluição para cada gene. A amostra com o menor Cq é considerada o valor máximo (igual a 1) e usada como referência para o cálculo das quantidades relativas das outras amostras. Depois, essas

quantidades relativas são normalizadas dividindo-as pela média geométrica dos dois genes de referência. Por fim, os valores de quantificação seguirão para a análise estatística.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software *Statistica 10* (Statsoft, Tulsa, OK, EUA). Experimentos envolvendo a linhagem como único fator foram analisados pelo teste t de Student. No experimento de RO e MC foi utilizado o teste t pareado para verificar diferenças entre as sessões dentro de um mesmo teste. Em relação aos dados obtidos na terceira estratégia experimental, as diferenças de quantidade entre os transcritos foram avaliadas através do teste t de Student. Na análise dos genótipos dos marcadores moleculares relacionados aos QTL significativos foi utilizado a ANOVA de uma via para o fator “genótipo”, sendo que sempre que necessário o teste de comparação de médias (*post-hoc*) *Newman-Keuls* foi aplicado. Valores de “p” menores ou iguais a 0,05 foram considerados como resultados significativos.

5 RESULTADOS

Resultados da primeira estratégia experimental

Uma análise de fator foi realizada a partir de oito medidas retiradas dos cinco testes comportamentais anteriormente descritos. O resultado encontra-se descrito na Tabela 1. Nas fêmeas analisadas, quatro fatores principais foram encontrados (fatores 1 ao 4), correspondendo 74% da variância total. O fator 1, foi responsável por 32% da variância total e correlacionou positivamente duas medidas dentro do mesmo teste (CA): a locomoção central (0,84) e a locomoção periférica (0,87). Essas medidas também foram correlacionadas positivamente com a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos durante a sessão treino (LCEM) (0,68) e com a alternância espontânea (AE) (0,69). Já o fator 2, foi responsável por 15% da variância total e correlacionou negativamente as duas variáveis medidas no MC: o tempo de congelamento (MC) (-0,54) e a tentativa de escape durante a sessão teste (MC) (0,87). O fator 3, foi responsável por 14% da variância total e correlacionou negativamente as duas medidas do LCEM: % tempo braços abertos treino (LCEM) (-0,46) e % tempo braço aversivo teste (LCEM) (0,93). Por fim, o fator 4 correlacionou apenas o índice de discriminação (RO) sendo responsável por 13% da variância total.

Tabela 1 - Análise de fator de traços fenotípicos quantificados em fêmeas da geração F2 LEW/SHR.

Medidas comportamentais	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
% tempo braços abertos treino (LCEM)	0,68		-0,46	
% tempo braço aversivo teste (LCEM)			0,93	
Locomoção central (CA)	0,84			
Locomoção periférica (CA)	0,87			
Índice de discriminação (RO)				0,98
Alternação espontânea (AE)	0,69			
Tempo de congelamento (s) (MC)		-0,54		
Tentativa de escape (MC)		0,87		
Variância total (%)	32%	15%	14%	13%

Quantificação de oito traços fenotípicos em 96 ratas (F2 LEW/SHR). Escores maiores que 0,4 são mostrados para cada fator. LCEM = labirinto em cruz elevado modificado, RO = reconhecimento de objetos, AE= alternância espontânea, MC = medo condicionado e CA = campo aberto.

Primeira análise de QTL – modelo sem covariável

Um QTL significativo ($p < 0,05$) foi encontrado nas fêmeas desse estudo, entre os marcadores D4Rat76 e D4Rat49 no cromossomo 4. O QTL possui um LOD score máximo de 2,83 para a medida “tempo no centro” na sessão de treino do LCEM (**Figura 10**).

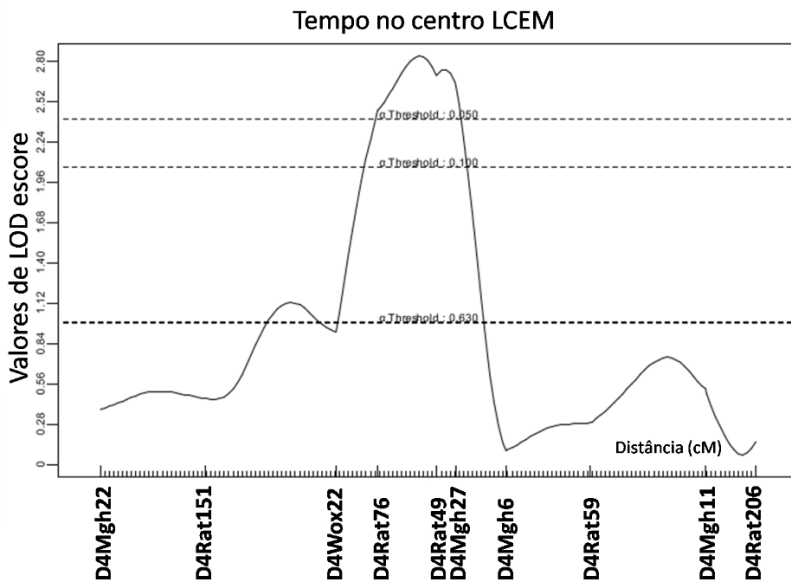


Figura 10 - QTL significativo encontrado para a medida “Tempo no centro” na sessão treino do Labirinto em cruz elevado modificado na análise de ligação realizada com 96 fêmeas F2 LEW/SHR. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD score. As linhas hachuradas representam, de cima para baixo na figura, os limiares (threshold) de significância ($p < 0,05$) e sugestividade ($p < 0,10$) e ($p < 0,63$), respectivamente.

Outro QTL significativo ($p < 0,05$) foi encontrado no LCEM para a medida “tempo no braço não aversivo”, mas na sessão de teste. Esse QTL está entre os marcadores: D4Rat59 e D4Mgh11 e possui um valor de LOD score máximo ainda maior: 3,21 (**Figura 11**).

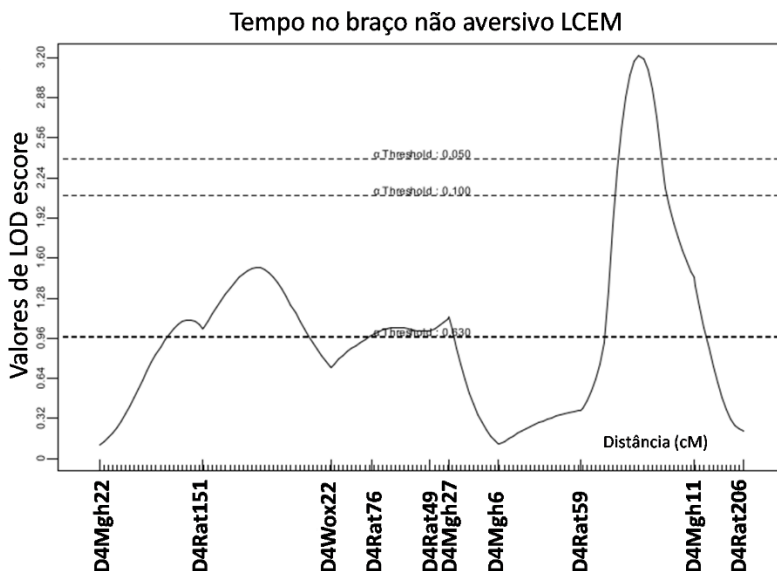


Figura 11 - QTL significativo encontrado para a medida “Tempo no braço não aversivo” na sessão teste do Labirinto em cruz elevado modificado na análise de ligação realizada com 96 fêmeas F2 LEW/SHR. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD score. Os limiares (*threshold*) de significância ($p < 0,05$) e sugestividade ($p < 0,10$) e ($p < 0,63$) estão representados pelas linhas hachuradas.

Segunda análise de QTL – modelo com covariável

Quando a covariável interativa “grupo” foi adicionada (ver seção 4.6) um QTL significativo novo ($p < 0,05$) foi encontrado. Esse QTL está relacionado à medida “locomotoção periférica” do CA, possui um LOD score de 4,11 e está localizado próximo ao marcador D4Mgh6 (**Figura 12**).

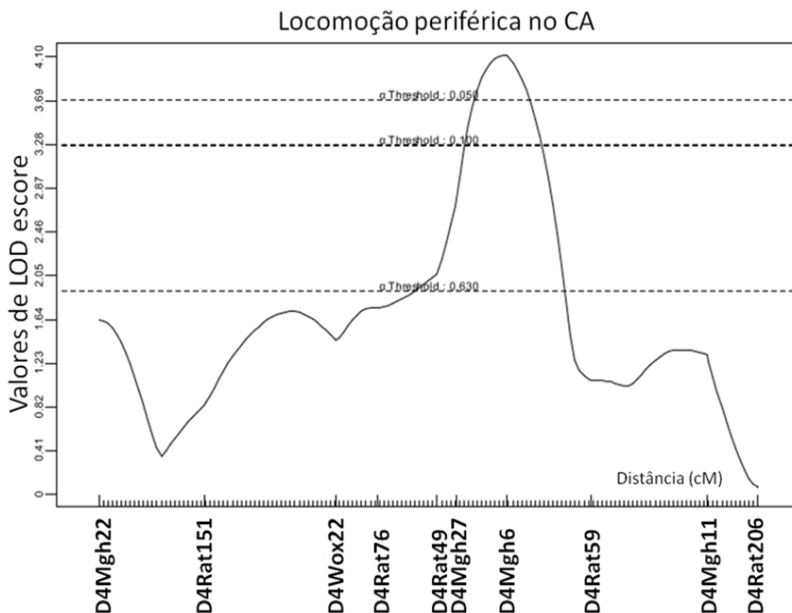


Figura 12 - QTL significativo encontrado para a medida “locomução periférica” no CA na análise de ligação realizada com 96 fêmeas F2 LEW/SHR. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD score. Os limiares (*threshold*) de significância ($p < 0,05$) e sugestividade ($p < 0,10$) e ($p < 0,63$) estão representados pelas linhas hachuradas. CA= Campo Aberto.

Quatro QTL sugestivos foram encontrados, sendo três deles relacionados a comportamentos da sessão teste do LCEM e o outro à locomução central do CA (**Figura 13**).

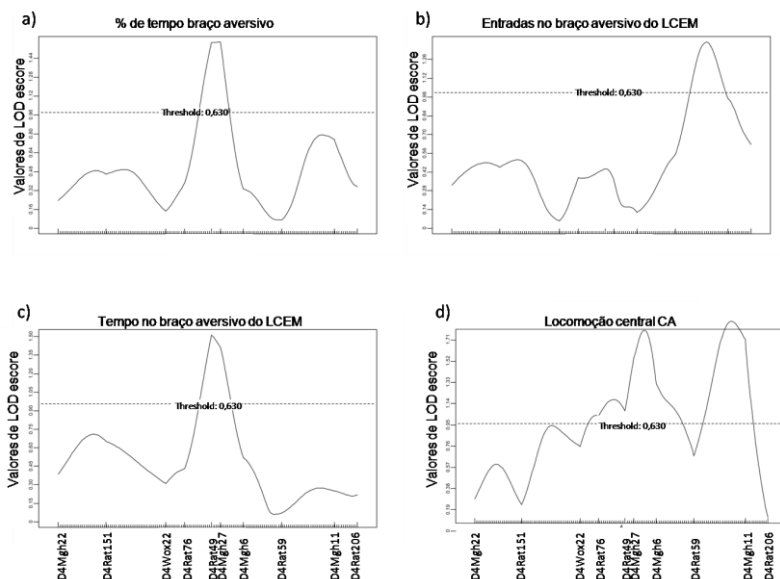


Figura 13 – QTL sugestivos encontrados na análise de ligação com as 96 fêmeas F2 LEW/SHR para: a) porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos do LCEM; b) número de entradas no braço aversivo do LCEM; c) tempo no braço aversivo do LCEM; d) locomoção central do CA. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD score. Os limiares (*threshold*) de sugestividade ($p < 0,630$) estão representados pelas linhas hachuradas. LCEM = Labirinto em Cruz Elevado Modificado, CA = Campo Aberto.

Considerando os três QTL significativos encontrados, a **Figura 14** apresenta os respectivos fenótipos e os genótipos dos animais segundo os marcadores moleculares que flanqueiam o pico do fenótipo em questão. Os resultados do tempo no centro do aparato LCEM durante a sessão de treino, no marcador D4Rat76, foram: $240,22 \pm 17,60$ ($n=26$) LEW/LEW; $276,60 \pm 21,70$ ($n=48$) LEW/SHR; $306,92 \pm 36,17$ ($n=22$) SHR/SHR. A ANOVA revelou um efeito significativo dos genótipos ($F_{(2,93)} = 5,82$; $p < 0,01$), sendo que o *post hoc* Newman-Keuls mostrou que os animais que carregam o genótipo LEW/LEW passaram a maior parte do tempo, durante a sessão de teste, na plataforma central do LCEM em comparação com os outros genótipos (**Figura 14a**). O marcador D4Rat49 é outro

marcador que está flanqueando o pico do QTL acima. Para esse marcador os três possíveis genótipos são: $212,84 \pm 9,24$ (n=19) LEW/LEW; $88,89 \pm 5,43$ (n=52) LEW/SHR; $83,21 \pm 6,04$ (n=25) SHR/SHR. A ANOVA revelou um efeito significativo dos genótipos ($F_{(2,93)} = 6,83$; $p < 0,01$), sendo que o *post hoc Newman-Keuls* mostrou que os animais que carregam o genótipo LEW/LEW também passam a maior parte do tempo na plataforma central do LCEM durante a sessão de teste em comparação com os outros genótipos (**Figura 14b**).

O resultado do tempo gasto no braço não aversivo durante a sessão teste do LCEM para o marcador D4Rat59 possui os três genótipos seguintes: $260,46 \pm 19,76$ (n=24) LEW/LEW; $257,08 \pm 20,90$ (n=50) LEW/SHR; $321,78 \pm 36,40$ (n=19) SHR/SHR. A ANOVA não revelou um efeito significativo dos genótipos ($p > 0,05$). O outro marcador que está flanqueando o pico deste fenótipo é o marcador D4Mgh11 (**Figura 14c**). Para o marcador D4Mgh11 os três possíveis genótipos para o tempo gasto no braço não aversivo durante a sessão teste do LCEM são: $248,45 \pm 26,34$ (n=21) LEW/LEW; $257,32 \pm 19,22$ (n=50) LEW/SHR; $346,85 \pm 31,32$ (n= 23) SHR/SHR. A ANOVA revelou um efeito significativo dos genótipos ($F_{(2,93)} = 4,00$; $p < 0,05$), sendo que o *post hoc Newman-Keuls* mostrou que os animais com o genótipo SHR/SHR passam a maior parte do tempo no braço não aversivo durante a sessão de teste do LCEM (**Figura 14d**).

O marcador D4Mgh6 é o marcador encontrado próximo ao pico do QTL para locomoção na periferia do CA. Para este marcador os resultados dos genótipos foram: $78,00 \pm 4,00$ (n=20) LEW/LEW; $74,00 \pm 3,00$ (n=51) LEW/SHR; $64,43 \pm 5,00$ (n=21) SHR/SHR. A ANOVA não revelou um efeito significativo dos genótipos ($p > 0,05$).

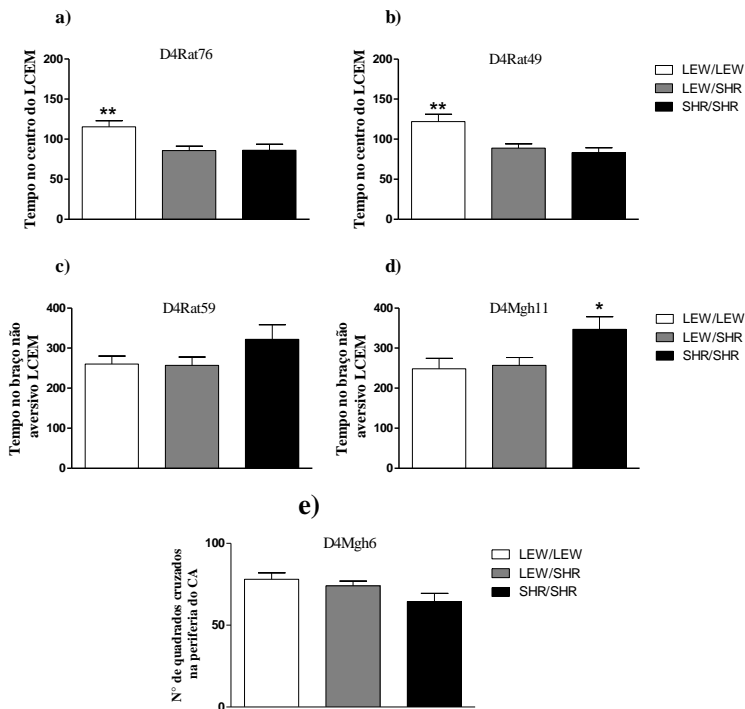


Figura 14 – Genótipos dos animais segundo o marcador D4Rat76 para o fenótipo “tempo no centro” na sessão treino do LCEM $240,22 \pm 17,60$ (n=26) LEW/LEW; $276,60 \pm 21,70$ (n=48) LEW/SHR; $306,92 \pm 36,17$ (n=22) SHR/SHR (a) genótipo dos animais segundo o marcador D4Rat49 para o fenótipo “tempo no centro” na sessão treino do LCEM $212,84 \pm 9,24$ (n=19) LEW/LEW; $88,89 \pm 5,43$ (n=52) LEW/SHR; $83,21 \pm 6,04$ (n=25) SHR/SHR (b) genótipos dos animais segundo o marcador D4Rat59 para o fenótipo “tempo no braço não aversivo” da sessão teste do LCEM $260,46 \pm 19,76$ (n=24) LEW/LEW; $257,08 \pm 20,90$ (n=50) LEW/SHR; $321,78 \pm 36,40$ (n=19) SHR/SHR (c) genótipos dos animais segundo o marcador D4Mgh11 para o fenótipo “tempo no braço não aversivo” da sessão teste do LCEM $248,45 \pm 26,34$ (n=21) LEW/LEW; $257,32 \pm 19,22$ (n=50) LEW/SHR; $346,85 \pm 31,32$ (n=23) SHR/SHR (d) genótipos dos animais segundo o marcador D4Mgh6 para o fenótipo “locomção periférica” do CA $78,00 \pm 4,00$ (n=20) LEW/LEW; $74,00 \pm 3,00$ (n=51) LEW/SHR; $64,43 \pm 5,00$ (n=21) SHR/SHR. (e). (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$. ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* Newman-Keuls.

Resultados da segunda estratégia experimental

ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A análise comportamental das linhagens SHR e SLA16 de forma geral seguiu os testes descritos anteriormente, variações pontuais (se caso empregadas) serão descritas abaixo. O número de animais usados em cada um dos testes está descrito nas legendas dos gráficos.

Labirinto em cruz elevado modificado

Na sessão de treino não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens para a porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos do LCEM (**Figura 15a**). Já na sessão de teste do LCEM, foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens. A linhagem SLA16 quando comparada à SHR apresentou maior percentual de tempo gasto nos braços aversivos ($p < 0,05$; **Figura 15b**).

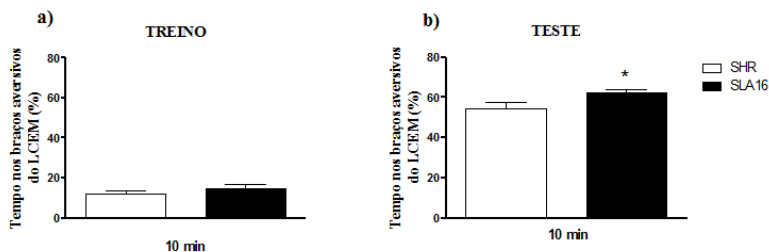


Figura 15 - Percentual de tempo gasto nos braços aversivos considerando toda a sessão treino no Labirinto em cruz elevado modificado (a); Percentual de tempo gasto nos braços aversivos considerando toda a sessão teste no Labirinto em cruz elevado modificado (b) pelas linhagens SLA16 e SHR ($n=12$ /linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) $p < 0,05$, segundo o teste t de Student.

No mesmo aparato foi medido o percentual de tempo gasto nos braços abertos durante a sessão de treino. Essa medida foi significativamente maior na linhagem SLA16 quando comparada à linhagem SHR ($p < 0,01$; **Figura 16a**). Na sessão de teste do LCEM não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens para a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (**Figura 16b**).

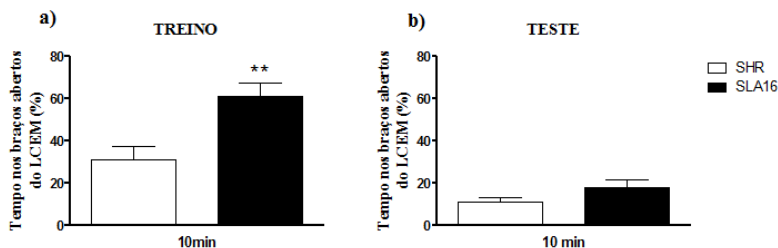


Figura 16 - Percentual de tempo gasto nos braços abertos considerando toda a sessão treino no do Labirinto em cruz elevado modificado (a); Percentual de tempo gasto nos braços abertos considerando toda a sessão teste no Labirinto em cruz elevado modificado (b) pelas linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (**) efeitos significativos do fator linhagem ($p < 0,01$), segundo o teste t de Student.

Considerando a medida “tempo no braço não aversivo” do LCEM durante a sessão de teste foi encontrada uma diferença significativa entre as linhagens SLA16 e SHR. A linhagem SHR gasta mais tempo nesse braço quando comparada à SLA16 ao ser considerado o tempo total do teste ($p < 0,05$; **Figura 17a**). Diferenças significativas entre as duas linhagens ainda foram encontradas na sessão de teste nos minutos finais (5-10 min) onde mais uma vez a linhagem SHR passa mais tempo no braço não aversivo quando comparada à SLA16 ($p < 0,05$; **Figura 17b**).

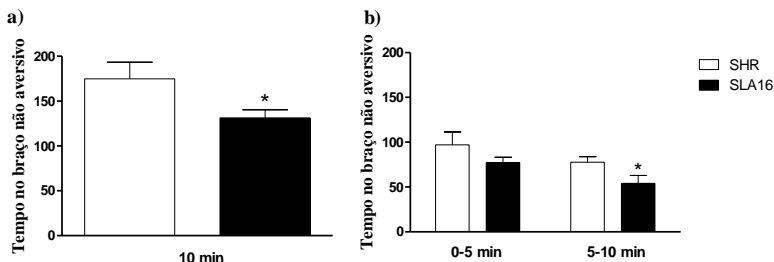


Figura 17 - Tempo gasto nos braços não aversivos considerando toda a sessão de teste (a) e em blocos de cinco minutos (b) durante o teste no Labirinto em cruz elevado modificado pelas linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) $p < 0,05$, segundo o teste t de Student.

Para a medida “tempo no centro” do LCEM durante a sessão de treino não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens SLA16 e SHR ($p = 0,19$; Figura 18).

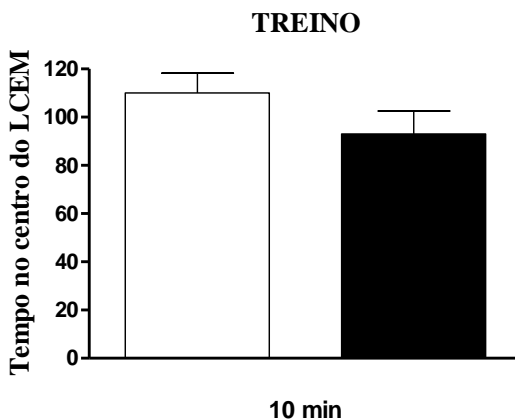


Figura 18 - Tempo gasto no centro do aparato Labirinto em cruz elevado modificado durante a sessão treino considerando toda a sessão pelas linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. Teste t de Student.

O número de entradas totais no LCEM foi usado para avaliar a atividade locomotora. O número de entradas totais da linhagem SLA16

na sessão de treino foi significativamente maior quando comparada à SHR ($p < 0,05$; **Figura 19a**). A mesma estratégia foi empregada na sessão teste do LCEM não sendo detectadas diferenças significativas entre as linhagens SLA16 e SHR na análise estatística empregada (**Figura 19b**).

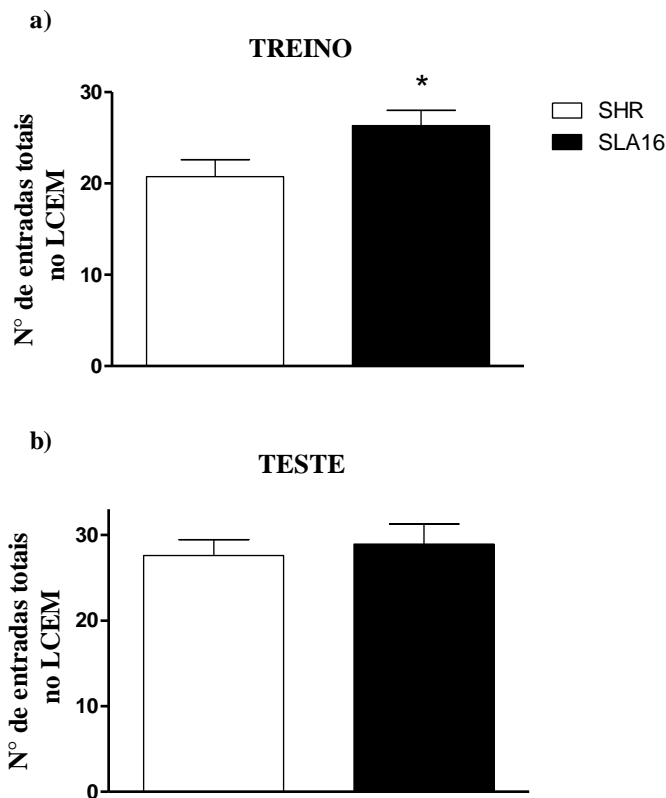


Figura 19 - Número de entradas totais na sessão de treino (a) e teste (b) do Labirinto em cruz elevado modificado pelas linhagens SLA16 e SHR ($n=12$ /linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) $p < 0,05$, segundo o teste t de Student.

Campo Aberto

No teste do CA a locomoção central e periférica da linhagem SLA16 foi significativamente maior que a da linhagem SHR ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente; **Figura 20a e 20b**). Além disso, o tempo gasto na área central do mesmo aparato também foi significativamente maior na linhagem SLA16 comparada à linhagem SHR ($p<0,01$; **Figura 20c**).

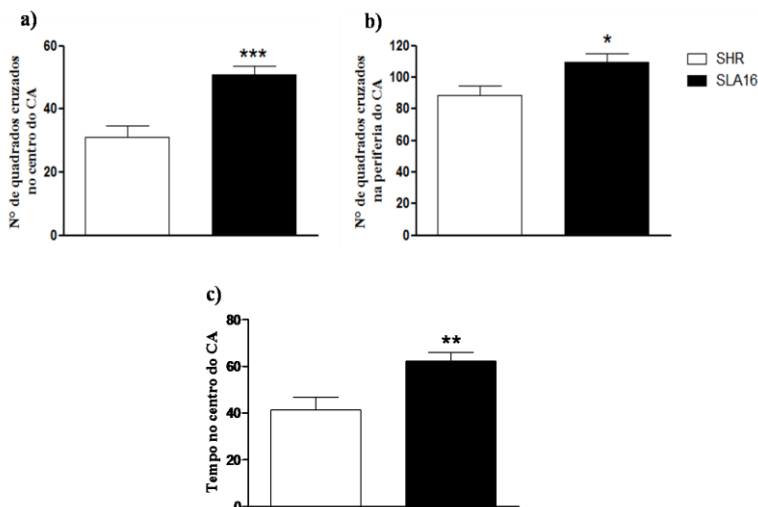


Figura 20 - Número de quadrados cruzados na região central (a), periférica (b) e tempo gasto na área central do CA por ratos das linhagens SLA16 e SHR ($n=12$ /linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) $p<0,05$ (**) $p<0,01$ (***) $p<0,001$, segundo o teste t de Student.

Reconhecimento de Objetos

No RO não foram observadas diferenças significativas no índice de discriminação dos objetos entre as linhagens SLA16 e SHR (**Figura 21a**). Já no tempo de exploração dos objetos, ambas as linhagens gastam mais tempo explorando mais o objeto novo em detrimento do familiar ($p<0,001$; **Figura 21b**).

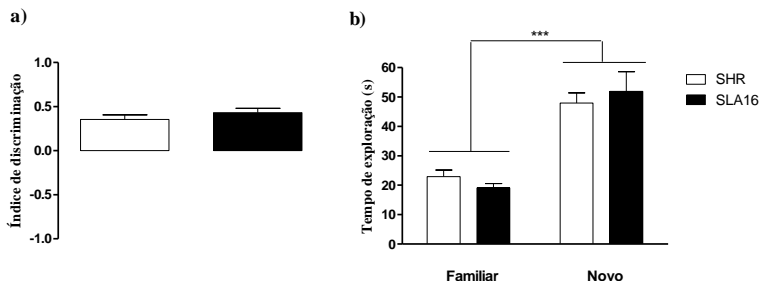


Figura 21 - Índice de discriminação de objetos (a) e tempo de exploração dos objetos (familiar e novo) (b) no teste de RO por ratos das linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). (***) $p < 0,001$, segundo o teste t pareado.

Alternação Espontânea

Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens SLA16 e SHR para a porcentagem de alteração espontânea ($p > 0,05$; **Figura 22a**) e total de entradas ($p > 0,05$; **Figura 22b**), parâmetros medidos no teste de AE.

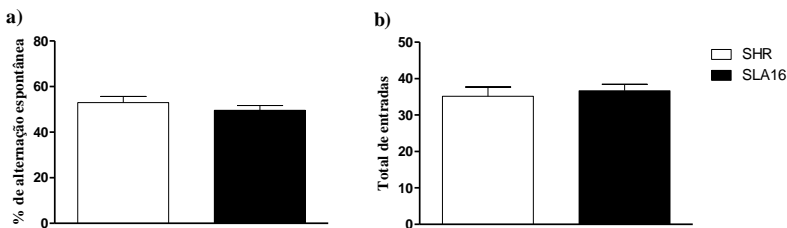


Figura 22 - Porcentagem de alteração espontânea (a) e total de entradas nos três braços (b) do teste de AE por ratos das linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). Teste t de Student.

Medo Condicionado

No teste do MC a sessão de treino foi dividida em duas fases: pré-condicionamento e condicionamento. Para a medida tempo de congelamento a sessão de pré-condicionamento diferiu significativamente das sessões de condicionamento e da sessão de teste ($p < 0,001$; $p < 0,01$; **Figura 23a**). Não foram encontradas

diferenças significativas entre as sessões de condicionamento e teste. Diferenças significativas entre as linhagens SHR e SLA16 para esse parâmetro foram encontradas somente na sessão de teste, onde a linhagem SHR possui um maior tempo de congelamento em relação à linhagem SLA16 (** $p < 0,01$; **Figura 23a**).

Para a tentativa de escape, diferenças significativas foram encontradas entre as sessões de pré-condicionamento e condicionamento (ambas no treino) em relação à sessão teste (### $p < 0,001$; # $p < 0,05$ respectivamente; **Figura 23b**). Para esta mesma medida não foi encontrada diferença significativa entre as linhagens SHR e SLA16 dentro de nenhuma das sessões (pré-condicionamento, condicionamento e teste), embora na sessão de teste exista uma tendência da linhagem SLA16 ($p = 0,06$) fazer mais o comportamento de tentativa de escape quando comparada à SHR (**Figura 23b**).

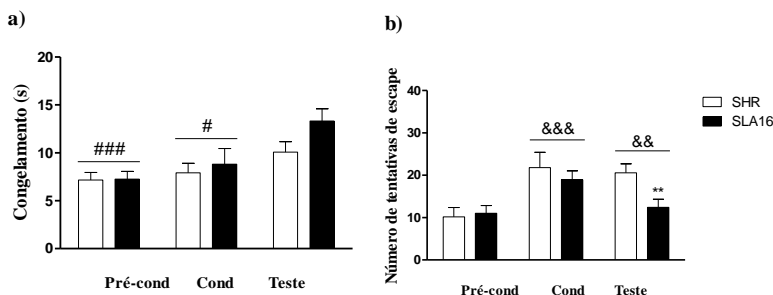


Figura 23 – Duração tempo congelamento medido em segundos (a) e do número de tentativas de escape de fêmeas das linhagens SLA16 e SHR ($n = 12$ /linhagem), durante as fases de pré-condicionamento (Pré-cond) e condicionamento (Cond) durante a sessão de treino e após o condicionamento contextual na sessão de teste (Teste). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (**) $p < 0,01$ representa diferença entre as linhagens, segundo o teste t de Student. (#) $p < 0,05$ diferença significativa do comportamento tentativa de escape entre a sessão condicionamento e a sessão teste; (###) $p < 0,001$ diferença significativa do comportamento tentativa de escape entre a sessão pré-condicionamento e a sessão teste; (&&) $p < 0,01$ diferença significativa do comportamento tempo de congelamento entre a sessão pré-condicionamento e a sessão teste; (&&&) $p < 0,001$ diferença significativa do comportamento tempo de congelamento entre a sessão pré-condicionamento e a sessão condicionamento segundo o teste t pareado.

Resultados da terceira estratégia experimental

Investigou-se a expressão do gene *Snca*, que codifica para a proteína alfa-sinucleína, nas fêmeas das linhagens SLA16 e SHR. A análise da expressão gênica seguiu os protocolos descritos anteriormente na seção de materiais e métodos. Os resultados revelam que a quantidade de RNAm transcrito do gene *Snca* no hipocampo e estriado das fêmeas da linhagem SHR é maior quando comparada a da linhagem SLA16 ($p < 0,05$) (**Figura 24**). Não foram encontradas diferenças significativas na expressão desse mesmo gene no córtex pré-frontal (**Figura 24**).

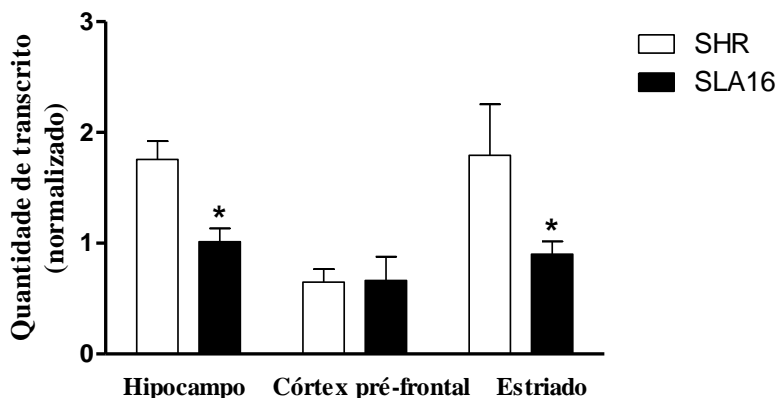


Figura 24 – Quantidade de RNAm (normalizado em relação ao gene *Gapdh* e *Ppia*) do gene *Snca* no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado, respectivamente, das fêmeas das linhagens SLA16 e SHR ($n=5-4$ /linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) $p \leq 0,05$, segundo o teste t de Student.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi dividido em três estratégias experimentais para testar as três hipóteses experimentais. De maneira geral, todas as hipóteses propostas foram confirmadas: na primeira hipótese os diferentes testes ansiedade e memória apresentam uma relação significativa dentro das variáveis estudadas. Também, há no cromossomo 4, QTL que influenciam para outras medidas comportamentais além das já descritas na literatura relacionadas à ansiedade/emocionalidade e/ou memória/aprendizado. A segunda hipótese: foram encontradas diferenças comportamentais contrastantes entre as linhagens SLA16 e SHR nos testes utilizados para avaliar memória/aprendizado e ansiedade/emocionalidade, corroborando dois dos três QTL aqui encontrados e a terceira hipótese: existe expressão diferencial do gene *Snca* em fêmeas das linhagens estudadas.

6.1 PRIMEIRA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A proposta de que as variáveis dos testes comportamentais de ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado apresentam uma correlação significativa em fêmeas fazia parte da primeira hipótese. Com a finalidade de respondê-la, uma análise de fator foi realizada usando as 96 fêmeas da geração F2 submetida a cinco testes comportamentais (LCM, CA, RO, AE e MC). Os resultados da análise de fator mostraram quatro fatores principais responsáveis por 74% da variabilidade total, que indicam correlações intra e inter-testes (**Tabela 1**).

A variabilidade correspondente ao fator 1 é a maior apresentada, com 32%. Neste fator, houve a correlação de duas medidas comportamentais, que aparentemente não seriam correlacionadas, mas que constantemente vem sendo encontradas no presente grupo de pesquisa: a locomoção central (0,84) e a locomoção periférica (0,87) no CA. Tradicionalmente a locomoção central e a locomoção periférica avaliam componentes emocionais diferentes: locomoção periférica é usualmente utilizada como índice de atividade locomotora e a locomoção central como um parâmetro de ansiedade/emocionalidade (RAMOS; MORMEDE, 1998). Trabalhos recentes do presente grupo, onde também foram encontradas correlações entre as duas medidas do CA (IZÍDIO et al., 2011; CORRÊA, 2015), levam a crer que pode haver algo em comum entre essas duas variáveis, visto que é difícil separá-las, uma vez que

ansiedade/emocionalidade podem modular os níveis de atividade locomotora (MORMEDE et al., 2002; ROY et al., 2009).

Correlacionada aos dois parâmetros acima citados está a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos durante a sessão de treino (LCEM) (0,68) e a alternância espontânea (AE) (0,69), uma medida de memória espacial. A porcentagem de tempo gasto nos braços abertos durante a sessão de treino também vem sendo usada como uma medida de ansiedade/emocionalidade no LCEM (RIBEIRO et al., 2010). A memória espacial avaliada através da AE, segundo a literatura, também pode apresentar desempenhos diferentes influenciados pela ansiedade/emocionalidade (MACHADO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2010).

A correlação dos parâmetros comportamentais anteriormente relacionados podem levar a uma interpretação do fator 1 como representando uma dimensão relacionada à atividade locomotora em ambientes novos, com influência da ansiedade/emocionalidade. Weiss et al. (1998) corroboram essa informação, pois afirmam que possivelmente o medo e a ansiedade influenciem comportamentalmente os animais expostos a testes que não sejam em seu ambiente familiar, induzidos pela novidade. Segundo a literatura, essas medidas poderiam compartilhar um substrato neurobiológico comum e desencadear reações emocionais, uma vez que todas as medidas correlacionadas no fator 1 são obtidas em ambientes nunca antes explorado pelos animais (DE MEDEIROS et al., 2013; IZÍDIO et al., 2011; MORMEDE et al., 2002).

O fator 2, corresponde a 15% da variância total, apresenta uma correlação negativa intra-teste das variáveis do MC: tempo de congelamento (-0,54) e a tentativa de escape do teste (0,87), que avaliam principalmente a memória emocional dos animais. Essa correlação pode ser interpretada como uma relação natural do MC, pois uma vez que se o animal está fazendo *freezing* (medido pelo tempo de congelamento) o mesmo não pode apresentar o outro comportamento defensivo avaliado neste teste, a tentativa de escape. O fator 3, responsável por 14% da variância total correlacionou negativamente as duas medidas do LCEM: porcentagem de tempo braços abertos treino (LCEM) (-0,46) e porcentagem de tempo braço aversivo teste (LCEM) (0,93). Como já comentado, a porcentagem de tempo nos braços abertos durante a sessão treino no LCEM vem sendo usada como medida de ansiedade/emocionalidade, já a porcentagem de tempo no braço aversivo

durante o teste no LCEM é usada como medida de memória/aprendizado (RIBEIRO et al., 2010).

Uma possível interpretação para os fatores 2 e 3 poderia ser feita levando em consideração a relação não só anatômica (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000), mas também fisiológica entre ansiedade/emocionalidade e aprendizado/memória. A literatura já discorre sobre o papel da ansiedade/emocionalidade nos processos de memória/aprendizado (EYSENCK et al., 2007; IZQUIERDO, 2011) e mesmo da memória/aprendizado influenciando a ansiedade/emocionalidade (BREWIN et al., 2010). Sabe-se ainda que fatores emocionais que regulam, por exemplo, os níveis de hormônios do estresse (como cortisol e noradrenalina) liberados no momento da codificação da memória emocional podem influenciá-la (MCGAUGH, 2004). A ansiedade poderia ser considerada um passo para a formação da memória (MATHEWS, 1990) e em níveis ótimos ajudaria na sua formação, consolidação e evocação da mesma (DAVIS; RAINNIE; CASSELL, 1994; EYSENCK et al., 2007; IZQUIERDO; MEDINA, 1997), porém um animal mais ansioso (que ultrapasse os níveis ótimos comentados anteriormente) sofreria prejuízos associados à memória/aprendizado.

O fator 4 correlaciona de maneira isolada o índice de discriminação (RO), correspondendo à 13% da variância total. Embora as classificações de memória sejam quase que exclusivamente antropomórficas (IZQUIERDO, 2011), o termo “*episodic-like memories*” (ou memórias “tipo” episódicas) vem sendo usado em estudos com animais, uma vez que, a consciência (usada na classificação da memória episódica em humanos) não é capaz de ser demonstrada nesses modelos (EASTON; WEBSTER; EACOTT, 2012). Esse tipo de memória é apontada como a principal memória encontrada em experimentos envolvendo animais de laboratório (IZQUIERDO, 2011). O RO é um teste de memória que não necessita de reforços positivos ou negativos para ser realizado, somente da habilidade do animal em reconhecer (ou não) o objeto novo em detrimento do antigo (exposto previamente) (ANTUNES BIALA, 2012). Diferentes tipos de memória podem ser avaliadas através do RO (ANTUNES; BIALA, 2012), sendo esse um modelo que possivelmente ajude a elucidar alguns mecanismos envolvidos com a “*episodic-like memories*” em mamíferos (WINTERS; SAKSIDA; BUSSEY, 2008). Algumas das vias neuronais e estruturas cerebrais responsáveis por esse tipo de memória é a amígdala basolateral e regiões que também regulam estados emocionais (como ânimo, alerta, ansiedade e outras emoções)

(IZQUIERDO, 2011). Devido a essa sobreposição de regiões reguladoras, pode-se assim dizer que o fator 4 possivelmente é fortemente influenciado pela ansiedade/emocionalidade.

A primeira hipótese desse trabalho ainda propõe que existem QTL no cromossomo 4 das fêmeas, além dos já descritos na literatura (IZÍDIO et al., 2011; RAMOS et al., 1999), que influenciam outras medidas comportamentais relacionadas à ansiedade/emocionalidade e/ou memória/aprendizado.

O primeiro QTL significativo é para a medida “tempo no centro” durante a sessão de treino do LCEM, localizado entre os marcadores D4Rat76 e D4Rat49 (**Figura 10**). Nesse comportamento, os animais F2 que possuíam os alelos LEW, em ambos os marcadores, passaram mais tempo no centro do LCEM durante a sessão treino do LCEM (**Figura 14a e b**). Nessa mesma região genômica, no estudo de Corrêa (CORRÊA, 2015), foi encontrado um QTL sugestivo para a medida “locomução central” no CA e um QTL significativo para a medida “distância percorrida” também no LCEM e também durante a sessão treino. Além disso, o QTL do presente estudo encontra-se localizado no final da região do segundo maior QTL relacionado a esses comportamentos: o *Anxrr16* (LOD score 7.22).

A medida “tempo no centro” não é uma medida comum de ser investigada durante o LCEM ou mesmo o LCE (labirinto em cruz elevado) tradicional. O QTL do presente estudo encontra-se localizado no final da região *Anxrr16*, isso somado ao fato de um dos QTL do estudo de Corrêa (CORRÊA, 2015) estar localizado na mesma região genômica no presente QTL, nos leva a supor que o QTL aqui estudado poderia também estar ligado com a emocionalidade do animal.

Segundo McFarland: “comportamento defensivo em mamíferos refere-se a qualquer comportamento que reduz as chances de um animal ser prejudicado” (MCFARLAND, 1987), sendo a avaliação de risco e o comportamento de esquiva, estratégias mais sutis adotadas pelos animais frente às características ambientais que podem evocar essas reações (BLANCHARD et al., 1993). A medida “tempo no centro” poderia ser entendida, pelo menos em parte, como um comportamento defensivo. Durante a sessão de treino do LCEM foi observado um comportamento exploratório que poderia ser considerado como envolvendo uma avaliação de risco. Essa interpretação é corroborada pela literatura que afirma que quando um animal é exposto a uma nova situação há um conflito de aproximação/esquiva desencadeado pelo estímulo da

novidade (MONTGOMERY, 1955; OHL, 2003).

O comportamento de avaliação de risco não é um parâmetro classicamente observado no LCEM, nem em outros testes comportamentais (RODGERS; DALVI, 1997), mas parece estar fortemente ligado ao medo/ansiedade e especula-se ser uma ferramenta mais precisa para avaliar a reatividade emocional em roedores (ROY; CHAPILLON, 2004; WANG et al., 2014).

Além disso, o QTL do presente estudo está localizado na mesma região genômica (marcador D6Rat76) que vem sendo descrita para a localização do gene *Snca*, que codifica para a proteína alfa-sinucleína. Um estudo usando as linhagens LEW e SHR propõe que as diferenças nos níveis de expressão do RNA mensageiro e da proteína alfa-sinucleína poderiam ser uns dos responsáveis pelas diferenças nos níveis de ansiedade/emocionalidade das linhagens investigadas (CHIAVEGATTO et al., 2009). Com o objetivo de responder se há ou não diferenças nos níveis de expressão desse mesmo gene nas linhagens SLA16 e SHR uma nova estratégia experimental foi aqui desenvolvida e os dados discutidos mais adiante (Tópico terceira estratégia experimental).

O segundo QTL significativo é para a medida “tempo no braço não aversivo”, durante a sessão de teste do LCEM e encontra-se entre os marcadores D4Rat59 e D4Mgh11 (**Figura 11**). Nesse comportamento, os animais F2 com os alelos SHR para o marcador D4Mgh11, passaram mais tempo no braço não aversivo do LCEM durante a sessão teste (**Figura 14c e d**). Como anteriormente comentado, no RGD há 18 QTL no cromossomo 4 do rato relacionados à ansiedade/emocionalidade, sendo um deles o *Anxrr16*.

Outros QTL significativos foram encontrados na mesma região, em machos, para três parâmetros de emocionalidade utilizados na caixa branca e preta (CBP): locomoção e tempo no compartimento branco e tempo no compartimento preto (IZÍDIO et al., 2011). Outro estudo utilizando machos, também revelou entre esses mesmos marcadores (D4Rat59 e D4Mgh11) um QTL altamente sugestivo para a “porcentagem de tempo no braço aberto” (CORRÊA, 2015). Tanto no presente estudo como no de Corrêa (2015) os QTL foram encontrados durante a sessão de teste do LCEM.

Assim, levando em consideração a literatura citada envolvendo a descoberta de outros QTL ligados à ansiedade/emocionalidade entre os mesmos marcadores e as considerações feitas sobre o QTL também estar localizado na região do QTL *Anxrr16*: o tempo no braço não aversivo

poderia ser interpretado com uma estratégia emocional diferente usada pelas fêmeas durante a sessão teste no LCEM em relação aos machos do trabalho de Corrêa (CORRÊA, 2015). Uma vez que, os QTL para porcentagem de tempo no braço aberto e o tempo no braço não aversivo estão entre os mesmos marcadores do cromossomo 4, pode-se sugerir que ambos os comportamentos possam ser influenciados pelos mesmos genes, mas assumem diferentes estratégias de enfrentamento em machos e fêmeas, pelo menos nas duas populações estudadas.

O terceiro QTL para a medida “locomoção periférica” do CA possui um LOD score de 4,11 e tem seu pico localizado no marcador D4Mgh6 (**Figura 12**). O QTL encontrado no presente estudo já foi descrito anteriormente nas mesmas linhagens (IZÍDIO et al., 2011) para esse parâmetro e está situado na região do *Anxrr16* (RAMOS et al., 1999), não sendo significativa a diferença do genótipo dos alelos nos animais F2 para esse comportamento (**Figura 14e**).

Estudos prévios realizados com as linhagens LEW e SHR revelaram que fatores ambientais podem influenciar diferenças comportamentais dessas linhagens (IZÍDIO et al., 2005). Com a intenção de aumentar o poder de detecção de um QTL pode-se alternativamente adicionar uma covariável nas análises. Caso esta covariável apresente um efeito forte sobre o fenótipo em questão, a análise considerando seus efeitos deverá revelar QTL mascarados por ela anteriormente. Com a adição da covariável “grupo” há o aparecimento desse QTL significativo ($p < 0,05$) para a medida “locomoção periférica” do CA.

Segundo o banco de dados RGD, há 12 QTL relacionados com a locomoção no cromossomo 4. No mesmo estudo de Izídio et al. (2011), que descreve previamente o presente QTL, há próximo a região do marcador D4Mgh6 um QTL significativo para machos e dois QTL sugestivos para fêmeas na fase diestro-proestro relacionado à locomoção central no CA (IZÍDIO et al., 2011). Apesar da locomoção central e a locomoção periférica serem usadas majoritariamente como índices de ansiedade/emocionalidade e atividade locomotora, respectivamente (RAMOS; MORMEDE, 1998), não há como separá-los completamente (TAKAHASHI et al., 2006) e a atividade motora pode ser influenciada pela ansiedade/emocionalidade (MORMEDE et al., 2002; ROY et al., 2009). Levando em consideração o QTL aqui encontrado e os dados da literatura, pode-se esperar, pelo menos nessa população, que a locomoção central e periférica do CA possivelmente sejam afetadas pelos mesmos genes. Os resultados encontrados na presente análise de fator (fator 1,

Tabela 1), bem como análises de fator anteriores feitas pelo presente grupo (IZÍDIO et al., 2011; CORRÊA, 2015), também vêm dando suporte a essa idéia, uma vez que a locomoção central e periférica se correlacionam no mesmo sentido.

Outros QTL sugestivos também foram encontrados para medidas de comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado (**Figura 13**). Três dos QTL sugestivos são para medidas do LCEM e para medidas que influenciam o braço aversivo durante a sessão teste: porcentagem de tempo no braço aversivo e tempo no braço aversivo, ambos entre os marcadores D4Rat49 e D4Mgh27 (**Figura 13a e c**, respectivamente); entradas no braço aversivo entre os marcadores D4Rat59 e D4Mgh 11 (**Figura 13b**). O outro QTL observado é para a medida locomoção central do CA, possuindo dois picos: um entre os marcadores D4Mgh27 e D4Mgh 6 e outro pico entre os marcadores D4Rat79 e D4Mgh6 (**Figura 13d**). De acordo com Flint et al. (2005) para ser revelado um QTL que contribua com menos de 5% da variação total do fenótipo que se está sendo estudado são necessários centenas de animais (FLINT et al., 2005). Possivelmente, alguns QTL tornariam-se significativos com o aumento do número de animais do presente estudo, que conta com 96 fêmeas F2.

Uma vez que todos os QTL encontrados estão localizados entre os marcadores D4Rat76 e D4Mgh11 (posição 84,9 Mpb e 171,2 Mpb, respectivamente) do cromossomo 4, utilizou-se na segunda estratégia experimental uma robusta ferramenta desenvolvida pelo presente laboratório: a linhagem congênica SLA16. Com o uso da linhagem congênica SLA16 e um rigoroso controle ambiental é possível inferir que as diferenças obtidas nos testes comportamentais aqui utilizados, em relação ao seu controle SHR, são devidas à região diferencial de 86,3Mb, derivada da linhagem LEW. Essa estratégia experimental também permite confirmar os QTL encontrados através de análises de QTL do presente e de estudos anteriores.

6.2 SEGUNDA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A segunda hipótese sugere que há diferenças comportamentais contrastantes entre as linhagens SLA16 e SHR nos testes utilizados para avaliar ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado. A linhagem SLA16 já foi previamente validada para testes comportamentais relacionados à ansiedade/emocionalidade em ambos os sexos (DE

MEDEIROS et al., 2013) e recentemente um estudo do mesmo grupo encontrou diferenças comportamentais significativas para essas linhagens utilizando machos (CORRÊA, 2015).

Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens SLA16 e SHR em relação ao percentual de tempo gasto nos braços aversivos durante a sessão treino do LCEM (**Figura 15a**). O baixo percentual gasto no braço aversivo durante a sessão treino pode ser explicado devido aos estímulos aversivos (luz e som) que os animais sofriam ao entrar no mesmo. Já na sessão de teste do LCEM, foram observadas diferenças significativas na porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos entre as linhagens SLA16 e SHR (**Figura 15b**). Esse resultado pode refletir, além de diferenças que poderiam ser atribuídas à aprendizagem, uma interpretação diferente entre as fêmeas das linhagens quanto ao estímulo aversivo, sua intensidade e duração. Isso poderia ocasionar o aumento do tempo gasto pela linhagem SLA16 no braço aversivo durante a sessão teste (**Figura 15b**). Houve um aumento nos escores da porcentagem de tempo gasto no braço aversivo durante a sessão de teste por ambas as linhagens em relação à sessão treino. Isso poderia sugerir que as fêmeas não conseguem evocar muito bem a memória aversiva, uma vez que, a porcentagem de tempo gasto no braço aversivo durante a sessão teste é um parâmetro utilizado para estudar memória/aprendizado (RIBEIRO et al., 2010). Usualmente as fêmeas são consideradas como tendo uma forte memória emocional, pois frequentemente apresentam redução na extinção de tarefas aversivas em testes comportamentais (CANLI et al., 2002; HAMANN, 2005). Levando isso em consideração, pode-se pensar que a elevada porcentagem de tempo gasto no braço aversivo durante a sessão teste poderia ser justificada devido aos estímulos utilizados (luz e som) durante a sessão treino não serem interpretados como tão aversivos assim, ou questionar-se se o tempo de 10 minutos seria suficiente para o animal aprender a tarefa e evocá-la na sessão teste.

Quanto ao percentual de tempo gasto nos braços abertos durante a sessão de treino do LCEM, a linhagem congênica SLA16 apresentou maior percentual de tempo gasto nesses braços que a linhagem SHR (**Figura 16a**). Como já comentado, o LCEM é um modelo que fornece ao mesmo tempo informações para o estudo da memória/aprendizado e medidas que avaliam a ansiedade/emocionalidade (RIBEIRO et al., 2010; SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000). Nesse sentido, a linhagem SLA16 possuir maior percentual de tempo gasto nos braços abertos durante a

sessão de treino indica menores índices de emocionalidade, ou seja, pode ser considerada “menos ansiosa” quando comparada à linhagem SHR. O estudo de Corrêa (CORRÊA, 2015) envolvendo machos das mesmas linhagens, corrobora o resultado encontrado no presente estudo, com destaque para os escores aqui encontrados em fêmeas serem maiores que os obtidos em machos. Estudos anteriores também dão suporte à ideia sugerida da linhagem SLA16 possuir menores índices de emocionalidade em relação à linhagem SHR (DE MEDEIROS et al., 2013; MEDEIROS et al., 2014).

Em relação à sessão de teste, não foram observadas diferenças significativas na exploração dos braços abertos entre as linhagens SLA16 e SHR (**Figura 16b**). Como o LCEM é uma “adaptação” do modelo clássico do LCE, algumas interpretações podem ser feitas baseadas nesse antigo modelo. Essa diminuição da exploração dos braços abertos encontrada na sessão teste quando comparada a exploração da sessão treino poderia ser interpretada com o comportamento conhecido como “tolerância de primeira exposição” (em inglês, “*one-trial tolerance*”) (FILE et al., 1990). A “tolerância de primeira exposição” é um fenômeno amplamente apresentado pelos animais e estudado por diversos pesquisadores, que ocorre na reexposição dos animais ao clássico LCE (para revisão, ver (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Diante de novas situações, os animais apresentam um conflito entre exploração e medo inato, apresentando comportamentos de aproximação/esquiva (MONTGOMERY, 1955) e na maioria das vezes, os animais gastam mais tempo explorando novos ambientes que antigos (BERLYNE, 1950). Essa diminuição da exploração dos braços abertos durante a sessão teste também poderia ser interpretada como uma mudança no “*drive*” exploratório dos animais que pode ocorrer durante a reexposição, onde o grau de novidade é diminuído, interferindo no comportamento exploratório (CHANG; YANG, 1950).

Considerando a medida “tempo no braço não aversivo” do aparato LCEM durante a sessão de teste foi encontrada uma diferença significativa entre as linhagens SLA16 e SHR (**Figura 17**). Esse resultado confirma o QTL significativo encontrado para a medida “tempo no braço não aversivo” do presente estudo (**Figura 11**). A linhagem SHR gasta mais tempo nesse braço, quando comparada com a linhagem SLA16, ao ser considerado o tempo total do teste (**Figura 17a**) e nos minutos finais (5-10 min) da sessão teste (**Figura 17b**). O aumento no tempo gasto explorando o braço não aversivo pode ser explicado pela mesma linha de

raciocínio acima descrita: durante a sessão treino do LCEM os animais de ambas as linhagens podem ter explorado os braços abertos a ponto de perderem o interesse/motivação por voltarem nesse braço durante a sessão teste. O interesse/motivação, durante a sessão teste seria voltado para os braços pouco ou ainda não explorados: braço aversivo (**Figura 15b**) e não aversivo (**Figura 17a**). Nesse sentido, há diferenças significativas entre as linhagens, onde a linhagem SLA16 explora mais o braço aversivo e a linhagem SHR explora mais o braço não aversivo. Como comentado anteriormente, a linhagem SLA16 é tida como mais “impulsiva”, o que poderia levar a essa maior exploração de áreas aversivas em relação à linhagem SHR. Já a linhagem SHR, por possuir maiores índices e ansiedade/emocionalidade, poderia preferir explorar o braço não aversivo durante a sessão teste, por ele não apresentar nenhum tipo de aversividade e ser considerado mais “seguro”.

Em relação à medida “tempo no centro” do LCEM, durante a sessão de treino, não foram encontradas diferenças significativas entre a linhagem SLA16 e a linhagem SHR (**Figura 18**). Assim, não confirmando o QTL encontrado durante a sessão de treino para a medida “tempo no centro” do LCEM (**Figura 10**). Uma possível alternativa para corroborar esse QTL através desse teste comportamental, seria o aumento do número amostral, pois há uma tendência na diferença de tempo no centro entre as duas linhagens. A permanência na plataforma central do LCEM durante a sessão de treino, por ambas as linhagens, poderia ser interpretada como o comportamento defensivo de avaliação de risco, observado algumas vezes no LCE tradicional (RODGERS; DALVI, 1997). Na tentativa de aproximar-se para explorar um dos braços do aparato, o animal gastaria grande parte do tempo na plataforma central (que interliga todos eles) praticando o comportamento de aproximação/esquiva classicamente observado e corroborado pela literatura por animais exposto a ambientes novos (MONTGOMERY, 1955; OHL, 2003). Devido ao “tempo no centro” não ser um parâmetro frequentemente estudado no LCEM e a proposta de uso desse aparato ser relativamente novo (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000), mais estudos são necessários para que se possa compreender melhor a estratégia apresentada pelas linhagens SLA16 e SHR através desse comportamento.

Com o intuito de medir a atividade locomotora o número de entradas em todos os braços do LCEM foi usado como parâmetro durante as sessões de treino e teste. A linhagem SLA16 diferiu significativamente da linhagem SHR apresentando um maior número de entradas durante a

sessão treino (**Figura 19a**), mas a diferença não foi observada durante a sessão teste (**Figura 19b**). Sugere-se que a linhagem SLA16 apresente uma maior atividade locomotora especialmente diante de ambientes não familiares (como na sessão treino), uma vez que a mesma não difere da linhagem SHR quando exposta a ambientes familiares (como na sessão teste, em que previamente são expostas na sessão treino). Esse resultado está de acordo com o observado por De Medeiros et al. (2013), onde se discute que esse aumento de atividade da linhagem SLA16, possivelmente devido ao *locus* diferencial, refletiria a modulação da reatividade emocional da linhagem por novidades ao invés de uma atividade locomotora espontânea (DE MEDEIROS et al., 2013). No mesmo estudo, ambas as linhagens, SLA16 e SHR, tiveram a atividade locomotora medida na caixa de atividade e nas caixas moradias (ambientes considerados familiares) e não tiveram diferenças significativas em relação à locomoção (DE MEDEIROS et al., 2013). O resultado encontrado no presente estudo corrobora ainda o QTL encontrado por Corrêa (2015), utilizando machos das mesmas linhagens SHR e SLA16, para o comportamento distância percorrida durante a sessão treino do LCEM (CORRÊA, 2015).

No teste do CA, as fêmeas da linhagem SLA16 apresentaram diferenças significativas das fêmeas da linhagem SHR para os três parâmetros observados no CA: “locomoção central”, “periférica” e “tempo no centro” (**Figura 20**). Os resultados encontrados no CA confirmam o QTL significativo encontrado no presente estudo para a medida “locomoção periférica” (**Figura 12**) e corroboram, mais uma vez, o QTL *Anxrr16* descrito por Ramos et al. (RAMOS et al., 1999). Desde o seu desenvolvimento por Calvin Hall, em 1934, o CA é um dos testes de emocionalidade mais usado no mundo inteiro (RAMOS; MORMEDE, 1998). Sugere-se que as fêmeas da linhagem SLA16 são menos “ansiosas” que as da linhagem SHR, uma vez que possuem índices de locomoção central maiores que os da linhagem SHR (**Figura 20a**). Ao longo do desenvolvimento da linhagem congênica SLA16 já era observado, através de um controle entre as gerações, uma redução nos níveis de ansiedade da mesma (DE MEDEIROS et al., 2013). Ainda sobre o trabalho De Medeiro et al. (2013), as fêmeas SLA16 também apresentaram menores índices de ansiedade/emocionalidade em relação às fêmeas da linhagem SHR no teste do CA (DE MEDEIROS et al., 2013). Um recente estudo realizado em nosso laboratório (CORRÊA, 2015), com o uso de machos, também considerou a linhagem SLA16

“menos ansiosa” quando comparada com a linhagem SHR. Entretanto, os escores encontrados em machos são menores que os apresentados pelas fêmeas do presente estudo. A interação sexo-genótipo é uma característica que tem sido observada nos estudos relacionados à emocionalidade realizados pelo presente grupo (RAMOS; MORMEDE, 1998; RAMOS et al., 1999, 2002). Como já comentado, ao longo do tempo houve a separação do CA em duas regiões distintas, que avaliam componentes emocionais também distintos. Nesse contexto, a locomoção periférica já foi muito usada meramente como índice de atividade locomotora (IZÍDIO et al., 2011; RAMOS; MORMEDE, 1998), atualmente se sabe que a ansiedade/emocionalidade pode influenciar também medidas como essa (MORMEDE et al., 2002; ROY et al., 2009). Um recente trabalho observou que a atividade locomotora de ambas as linhagens, SLA16 e SHR, não apresentam diferenças significativas (DE MEDEIROS et al., 2013). Assim, possivelmente as distinções entre as linhagens SLA16 e SHR, onde as fêmeas da linhagem SLA16 passam mais tempo na periferia, não seja devido à sua atividade locomotora aumentada e sim à baixa reatividade emocional apresentada pelas fêmeas dessa linhagem diante de um ambiente novo. Os resultados da presente análise de fator (Tabela 1) e de outras encontradas na literatura (IZÍDIO et al., 2011) apóiam a ideia que a locomoção periférica muitas vezes se correlaciona com a locomoção central.

Não foram reveladas diferenças significativas entre as fêmeas das linhagens SLA16 e SHR quanto ao índice de discriminação de objetos no RO (**Figura 21a**). Porém, o resultado do índice de discriminação (ID) ser positivo, somado ao fato das fêmeas explorarem mais o objeto novo em detrimento do familiar (**Figura 21b**), indica que a tarefa foi aprendida (BURKE et al., 2010). Esse resultado é corroborado por outros estudos presentes na literatura, que indicam que há uma exploração natural maior pelo objeto novo do que pelo familiar (previamente apresentado) (BAXTER, 2010; ENNACEUR, 2010) embora os resultados possam divergir de acordo com as variações metodológicas que forem empregadas (ANTUNES; BIALA, 2012). Pode-se sugerir que as linhagens SLA16 e SHR não apresentam prejuízo quanto à “*episodic-like memories*”, pelo menos nas populações estudadas e de acordo com a metodologia aqui utilizada.

Os resultados da AE propõem que não há diferença na memória espacial entre as fêmeas das linhagens SLA16 e SHR, uma vez que não apresentaram diferenças significativas para a porcentagem de alternância

espontânea (**Figura 22a**). A fim de avaliar a atividade locomotora dos animais, foi avaliado o número total de entradas em todos os braços do aparato, também não apresentando diferenças significativas entre as fêmeas das linhagens (**Figura 22b**). Previamente, diferenças significativas na atividade locomotora entre as linhagens foram encontradas em testes envolvendo um componente emocional (DE MEDEIROS et al., 2013). Porém, essa ausência de diferença na atividade locomotora entre as linhagens pode ser explicada através da proposta do teste de AE que é avaliar o desempenho da memória espacial sem o uso de estímulos aversivos (RIBEIRO et al., 2010).

Os resultados da porcentagem de alternância espontânea e número total de entradas estão de acordo com os resultados encontrados em machos das linhagens SLA16 e SHR (CÔRREA, 2015), porém o número total de entradas em fêmeas possui escores mais altos do que os apresentados por machos para esse mesmo parâmetro. Pode-se hipotetizar ainda que os escores mais altos apresentados por fêmeas das linhagens SLA16 e SHR em relação aos machos da mesma linhagem também poderiam ser justificados pela ausência de componentes aversivos no teste de AE, onde as fêmeas poderiam não reter tão bem a memória, precisando de um maior número de entradas (através de tentativa e erro) para formar a sequência de uma alternância espontânea. A literatura dá suporte a essa ideia, pois, como já comentado, usualmente as fêmeas são consideradas como tendo uma forte memória emocional e apresentando redução na extinção especialmente em tarefas com componentes aversivos (CANLI et al., 2002; HAMANN, 2005).

No teste do MC, em relação ao tempo de congelamento, a sessão de pré-condicionamento apresentou diferença significativa das sessões de condicionamento e teste, exibindo menos tempo o comportamento de “freezing” (**Figura 23a**). Essa diferença já era esperada, uma vez que, a sessão de pré-condicionamento ocorre antes da distribuição dos choques nas patas e nenhum estímulo aversivo é aplicado até então sobre os animais. As respostas de medo condicionadas são esperadas posteriormente a sua apresentação (que ocorrem na sessão de condicionamento), na sessão de teste (FENDT; FANSELOW, 1999) e o comportamento de *freezing* apresentado somente mais tarde sugere que os animais apreenderam a tarefa. Dentro da sessão teste há uma diferença significativa entre as linhagens, onde as fêmeas da linhagem SHR exibem por mais tempo o comportamento de congelamento em relação às fêmeas da linhagem SLA16 (**Figura 23a**).

Em relação ao comportamento “tentativa de escape”, a sessão teste difere significativamente das sessões de pré-condicionamento e de condicionamento (Figura Gb). Embora dentro da sessão teste não sejam encontradas diferenças significativas entre as linhagens, pode-se perceber uma tendência ($p=0,06$) das fêmeas da linhagem SLA16 apresentarem mais tentativas de escape em relação às fêmeas da linhagem SHR (**Figura 23b**). A sessão teste, para ambos os comportamentos, ocorre 24 horas depois de receberam o choque nas patas (estímulo aversivo na sessão condicionamento). Há na literatura trabalhos que discorrem sobre a influência que a ansiedade/emocionalidade pode ter sobre a memória/aprendizado, e vice-versa (EYSENCK et al., 2007; IZQUIERDO, 2011) (BREWIN et al., 2010). Neste sentido, poderia-se hipotetizar que estratégias comportamentais diferentes poderiam ser adotadas pelas fêmeas das linhagens SLA16 e SHR, ao evocarem através da memória emocional o estímulo aversivo que receberam no dia anterior. A memória emocional, por sua vez, possivelmente seria modulada pelos níveis de hormônios do estresse (como cortisol e noradrenalina), liberados no momento da codificação da memória emocional, durante a fase de condicionamento ao receberem o choque nas patas (estímulo aversivo). Assim, a linhagem SHR, considerada “mais ansiosa” em relação à linhagem SLA16, apresenta mais o comportamento de congelamento na sessão teste do MC, já a linhagem SLA16, durante essa mesma sessão tende a apresentar uma estratégia de enfrentamento mais ativa e exibir mais o comportamento de tentativa de escape. Essa forma ativa ou passiva dos animais enfrentarem desafios ambientais que consideram ameaçadores é discutida na literatura, mas basicamente: estratégias comportamentais diferentes dependem de mecanismos fisiológicos distintos (KOOLHAAS et al., 2010; METNA-LAURENT et al., 2012). Informação esta que dá suporte à ideia da memória emocional ser modulada de forma distinta pelos diferentes níveis de hormônios do estresse nas duas linhagens, levando-as a adotar diferentes formas de enfrentamento na sessão teste. Essa diferença na forma de enfrentamento praticada pelas linhagens SLA16 e SHR, também foi encontrada na sessão teste em machos das mesmas linhagens por CÔRREA, 2015.

Comportamentos relacionados à ansiedade e ao medo condicionado não possuem uma relação genética bem definida, embora se saiba das muitas similaridades neuroanatômicas e farmacológicas (PONDER et al., 2007). Os resultados aqui apresentados em relação ao MC, ainda corroboram a existência do QTL para o comportamento

“tentativa de escape”, em machos das mesmas linhagens, encontrado no estudo de CÔRREA, 2015. Esse QTL está localizado no *locus* diferencial presente na linhagem SLA16 podendo assim sugerir, ao menos nas linhagens estudadas, que essas regiões são pelo menos parcialmente sobrepostas.

Na segunda estratégia experimental, através dos testes comportamentais utilizados, houve a confirmação de dois dos QTL significativos encontrados: “tempo no braço não aversivo” e “locomotoção periférica”. Além disso, observou-se que a linhagem SLA16 apresenta menores índices de ansiedade/emocionalidade que a linhagem SHR, porém, em testes envolvendo memória/aprendizado apenas quando os mesmos envolviam componentes emocionais foram observadas diferenças significativas. O gene *Snca*, localizado na mesma região do QTL aqui encontrado para medida “tempo no centro”, tem sido proposto como um bom gene candidato para possivelmente explicar os efeitos comportamentais do *Anxrr16*. Assim, na terceira estratégia experimental foi verificada a expressão desse gene em áreas envolvidas com memória e ansiedade (FANSELOW; DONG, 2010; ROSSATO et al., 2006).

6.3 TERCEIRA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A avaliação de genes candidatos é uma estratégia que pode ser usada para encontrar os genes (ou o gene) envolvidos na variação das características em estudo e a expressão gênica é uma ferramenta que pode ser utilizada para tal função (FERNANDES et al., 2004). Como já comentado anteriormente, devido aos robustos resultados encontrados no estudo de Chiavegatto et al. (2009), o QTL para a medida “tentativa de escape” estar próximo da posição do gene *Snca* (CÔRREA, 2015) e esse gene encontrar-se dentro da região diferencial, o presente grupo de pesquisa persevera nos estudos envolvendo esse gene candidato para possivelmente explicar os efeitos comportamentais diferenciais entre as linhagens SLA16 e SHR.

Além da literatura supracitada, na análise de QTL do presente estudo encontrou-se um QTL para a medida “tempo no centro” na mesma região do gene *Snca*. Com o intuito de investigar se há ou não diferença nos níveis de expressão desse mesmo gene nas linhagens SLA16 e SHR realizou-se a expressão gênica de *Snca* na terceira estratégia experimental.

Encontrou-se uma maior quantidade de RNAm da alfa-sinucleína expressa no hipocampo e estriado das fêmeas da linhagem SHR em relação às da linhagem SLA16 (**Figura 24**). Em relação à outra área estudada (córtex pré-frontal) não foi encontrada diferenças significativas (**Figura 24**). Devido à ansiedade ser uma comorbidade encontrada em doenças como o Parkinson e o alcoolismo (BOLLUK et al., 2010; CHEN; MARSH, 2013; MORRIS; STEWART; HAM, 2005; TERRA et al., 2006) e a alfa-sinucleína também estar associada com essas doenças (LIANG; CARR, 2006; LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 2013; PERFEITO; REGO PROF., 2012), sugere-se que a alfa-sinucleína poderia também estar envolvida com a ansiedade/emocionalidade (CHIAVEGATTO et al., 2009; GRAHAM; SIDHU, 2010; PEÑA-OLIVER; BUCHMAN; STEPHENS, 2010).

Chiavegatto *et al* (2009) sugere ainda a possibilidade do papel da alfa-sinucleína modular a ansiedade através da regulação de mecanismos relacionados ao sistema dopaminérgico, uma vez que, as vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical estão associadas com a modulação da emocionalidade (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2015). Estudos sugerem que essa modulação através da alfa-sinucleína poderia diminuir a síntese de dopamina ao inibir a enzima tirosina hidroxilase (PENG et al., 2005; PEREZ et al., 2002). Outro mecanismo que ainda continua sendo investigado seria a sua atuação na regulação da atividade do transportador de dopamina (DAT), reduzindo a recaptção da dopamina (WERSINGER; SIDHU, 2003; WERSINGER et al., 2003). Acredita-se que a diminuição da dopamina nas suas vias cerebrais poderia contribuir, mesmo que indiretamente, para a regulação de comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade.

De modo curioso, a linhagem LEW (considerada “mais ansiosa”) apresenta maior expressão nos níveis de RNAm da alfa-sinucleína no hipocampo em relação à linhagem SHR (considerada “menos ansiosa”) (CHIAVEGATTO et al., 2009). Essa maior expressão de RNAm na linhagem LEW do estudo de Chiavegatto *et al* (2009) vem acompanhada de um aumento na expressão da proteína alfa-sinucleína e de uma diminuição na concentração do metabólito da dopamina (DOPAC) e de sua taxa (DOPAC/DA) na mesma região. Já no presente estudo, a linhagem SHR (considerada “mais ansiosa” que a linhagem SLA16) apresenta maior expressão nos níveis de RNAm da alfa-sinucleína no hipocampo e no estriado em relação à linhagem SLA16 (considerada “menos ansiosa” quando comparada à linhagem SHR).

Com o intuito de aprofundar a investigação em relação ao sistema dopaminérgico e a sua participação na modulação da ansiedade das linhagens SLA16 e SHR, recentemente o presente grupo quantificou, na região do hipocampo, o nível de expressão dos receptores D2 e DAT (CORVINO, 2015). Não foram encontradas diferenças significativas em relação à quantidade desses receptores, entre as linhagens SLA16 e SHR. As regiões que codificam esses receptores D2 e DAT estão localizadas no rato nos cromossomos 8 e 1, respectivamente. Ou seja, as regiões são iguais nas linhagens SLA16 e SHR. Assim, como é sugerido no estudo de Corvino (2015), possivelmente as diferenças farmacogenéticas que ali foram encontradas sejam devido ao *locus* diferencial. É razoável se pensar que as diferenças na expressão gênica encontradas também no presente estudo possivelmente influenciem fortemente os mecanismos dopaminérgicos, através da alfa-sinucleína, modulando ansiedade/emocionalidade.

Embora o gene *Snca* seja um bom candidato para explicar as diferenças comportamentais entre as linhagens e esteja localizado na mesma região do QTL encontrado para a medida “tempo no centro, é importante salientar que não foram realizados experimentos que comprovem que o aumento de expressão de alfa-sinucleína tenha uma correlação direta com a ansiedade/emocionalidade. Os resultados aqui apresentados referentes aos níveis de RNAm da alfa-sinucleína são apenas evidências associativas. O hipocampo e o estriado (CAMPBELL et al., 2004; GOLDFARB et al., 2016; IRLE et al., 2010; ROSSATO et al., 2006; SCHWABE; WOLF, 2012), bem como a alfa-sinucleína e seus os níveis de expressão gênica tem sido associado com estudos de ansiedade/emocionalidade (CHIAVEGATTO et al., 2009; GRAHAM; SIDHU, 2010; PEÑA-OLIVER; BUCHMAN; STEPHENS, 2010), porém os resultados muitas vezes são inconclusivos, tornando-se necessários mais estudos acerca desse assunto. Além da função do hipocampo relacionada à emocionalidade muitos estudos realizados ao longo dos anos que comprovam a sua ligação, assim como a do estriado, também com os processos de memória/aprendizagem (DIAMOND et al., 2007; HAO et al., 2016; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; SCHWABE; WOLF, 2012).

Com base na literatura outros genes, presentes dentro dos 86,3 Mpb que compreende o *locus* diferencial *Anxrr16*, poderiam ser indicados como potenciais candidatos para tentar explicar seus efeitos. Entre esses genes pode-se citar: *Neuropeptide Y (Npy)*, *Corticotropin releasing*

hormone receptor 2 (Crhr2), Glutamate Receptor-Interacting Protein2 (Grip2), Tachykinin receptor 1 (Tacr1), Glutamate receptor ionotropic delta 2 (Grid2), (para revisão, ver (MEDEIROS; CORRÊA; CORVINO, 2014b). Futuramente estudos subsequentes utilizando outras abordagens mais refinadas como: linhagens sub-congênicas, sequenciamento de genes, microarrays, entre outros, poderão contribuir para identificar a função e as relações dos diversos genes presentes no *locus* diferencial.

7 CONCLUSÕES

A primeira hipótese desse trabalho foi confirmada, pois há correlação significativa entre as variáveis dos testes comportamentais realizados, explicando 74% da variabilidade total através de quatro fatores, sugerindo que as medidas dos testes de ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado possuam um substrato neurobiológico comum.

Além disso, há, no cromossomo 4, outros QTL que influenciam para outras medidas comportamentais além das já descritas na literatura relacionadas à ansiedade/emocionalidade e/ou memória/aprendizado. Foram encontrados três QTL nesse cromossomo, sendo dois deles (tempo no centro, durante a sessão treino, e tempo no braço não aversivo, durante a sessão teste, ambos no LCEM) inéditos na literatura.

A segunda hipótese foi parcialmente confirmada: dois dos QTL encontrados (tempo no braço não aversivo durante a sessão teste no LCEM e locomotoção periférica no CA) foram corroborados através das diferenças comportamentais contrastantes entre as linhagens SLA16 e SHR. A linhagem SLA16 apresenta menores índices de ansiedade/emocionalidade em relação à linhagem SHR, bem como exibe diferenças em relação à memória e aprendizado especialmente em testes que envolvam emocionalidade. Sugere-se que as diferenças encontradas sejam devidas ao *locus* diferencial, assim, confirmando mais uma vez seu efeito na emocionalidade e agora o associando à memória aversiva.

Em relação à terceira hipótese, realmente há diferença (no hipocampo e estriado) na expressão do gene *Snca* em fêmeas das linhagens estudadas. Sugere-se, portanto, que o gene *Snca* continue sendo investigado nas próximas abordagens do presente grupo de pesquisa, uma vez que ele tem se revelado um gene candidato promissor para explicar os efeitos do *locus* diferencial.

Assim, o presente estudo identificou QTL inéditos na literatura, que influenciam medidas de ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado, os confirmou com o uso da linhagem congênica SLA16 e conclui que possivelmente o gene *Snca* seja um dos principais responsáveis pelas diferenças de ansiedade/emocionalidade e memória/aprendizado atribuídas ao *locus* diferencial.

REFERÊNCIAS

- ABIOLA, O. et al. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 11, p. 911-916. 2003.
- AGGLETON, J. P.; ALBASSER, M. M.; AGGLETON, D. J. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 55–68, 2010.
- AITMAN, T. J. et al. Progress and prospects in rat genetics : a community view. **Nature genetics**, v. 40, n. 5, p. 516–522, 2008.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.
- BAXTER, M. G. “I’ve seen it all before”: explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). **Behavioral neuroscience**, v. 124, n. 5, p. 706–709, 2010.
- BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–72, jan. 2011.
- BERLYNE, B. Y. D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploration behaviour. **The British Journal of Psychiatry**, v. 41, p. 68–80, 1950.
- BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Pleasure systems in the brain. **Neuron**, v. 86, n. 3, p. 646-664, 2015.
- BICE, P. et al. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. v. 955, p. 949–955, 1998.

BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1-2, p. 155–165, 1993.

BOLLUK, B. et al. Social anxiety in patients with Parkinson's disease. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 22, n. 4, p. 390–394, 2010.

BREWIN, C. R. et al. Intrusive images in psychological disorders: characteristics, neural mechanisms, and treatment implications. **Psychological review**, v. 117, n. 1, p. 210–232, 2010.

BRYDA, E. C. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. **Missouri Medicine**, v. 110, n. 3, p. 207–211, 2013.

BURKE, S. N. et al. Pattern Separation Deficits May Contribute to Age-Associated Recognition Impairments. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 5, p. 559–573, 2010.

CALDARONE, B. et al. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 335–337, 1997.

CAMPBELL, S. et al. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. **The American journal of psychiatry**, v. 161, n. 4, p. 598–607, 2004.

CANLI, T. et al. Sex differences in the neural basis of emotional memories. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10789–10794, 2002.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005.

CARR, L. et al. A Quantitative Trait Locus for Alcohol Consumption in Selectively Bred Rat Lines. v. 22, n. 4, p. 884–887, 1998.

CHABY, L. E. et al. Can we understand how developmental stress enhances performance under future threat with the Yerkes-Dodson law? **Communicative & Integrative Biology**, v. 8, n. 3, p. e1029689, 2015.

CHANG, S.; YANG, K. The exploratory drive of the rat. **Acta Psychologica Taiwanica**, v. 3, p. 44–56, 1950.

CHEN, J. J.; MARSH, L. Anxiety in Parkinson's disease: identification and management. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 7, n. 1, p. 52–59, 2013.

CHIAVEGATTO, S. et al. Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular psychiatry**, v. 14, n. 9, p. 894–905, set. 2009.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical Threshold Values for Quantitative Trait. **Genetics**, v. 138, n. 1, p. 963–971, 1994.

COHEN, H.; MATAR, M. A.; RICHTER-LEVIN, G. A. L. The Contribution of an Animal Model Toward Uncovering Biological Risk Factors for PTSD. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 350, p. 335–350, 2006.

CORRÊA, F. J. O cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à memória em um modelo genético de ratos. 2015. 121p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CORVINO, M. E. Investigação da participação do receptor dopaminérgico D2 nas diferenças comportamentais, relacionadas à ansiedade, das linhagens SHR e SLA16. 2015. 90p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DANNLOWSKI, U. et al. Limbic scars: Long-term consequences of childhood maltreatment revealed by functional and structural magnetic resonance imaging. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 4, p. 286–293, 2012.

DAVIDS, E. et al. A nimal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Brain Research Reviews**, v. 42, p. 1–21, 2003.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 5, p. 208–214, 1994.

DE CARVALHO, L. M. Regulação transcricional de genes envolvidos no sistema de recompensa em um modelo animal de ingestão de dieta hipercalórica e etanol. 2015. 56p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

DE MEDEIROS, G. F. et al. Low-anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83666, jan. 2013.

DIAMOND, D. M. et al. The Temporal Dynamics Model of Emotional Memory Processing : A Synthesis on the Neurobiological Basis of Stress-Induced Amnesia , Flashbulb and Traumatic Memories , and the Yerkes-Dodson Law. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. 1–33, 2007.

DIAS, G. P. Caracterização fenotípica dos efeitos do QTL Anxrr16 através do uso de ratas das linhagens congênica SLA16 e SHR. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Curso de Graduação em Biologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

EASTON, A.; WEBSTER, L. A. D.; EACOTT, M. J. The episodic nature of episodic-like memories. **Learning and Memory**, v. 19, p. 146–150, 2012.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Research**, v. 142, p. 53–62, 2003.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 244–254, 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats . 1 " Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, p. 47–59, 1988.

EYSENCK, M. W. et al. Anxiety and cognitive performance: attentional control theory. **Emotion (Washington, D.C.)**, v. 7, n. 2, p. 336–353, 2007.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 1–25, 2010.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 743–760, 1999.

FERNANDES, C. et al. Hippocampal gene expression profiling across eight mouse inbred strains: towards understanding the molecular basis for behaviour. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 2576–2582, 2004.

FILE, S. E. et al. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 100, p. 281–282, 1990.
FLAHERTY, L.; BOLIVAR, V. Congenic and consomic strains. In: JONES, B. C.; MORMÈDE, P. **Neurobehavioral Genetics: Methods and Applications**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 115–127 p.

FLINT, J. Genetic effects on an animal model of anxiety. v. 529, p. 131–134, 2002.

FLINT, J. et al. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 4, p. 271–286, 2005.

GIBBS, R. A. et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, n. April, p. 493–521, 2004.

GOLDFARB, E. V et al. Memory-Guided Attention : Independent Contributions of the Hippocampus and Striatum Report Memory-Guided Attention : Independent Contributions of the Hippocampus and Striatum. **Neuron**, v. 89, p. 1–8, 2016.

GOSWAMI, S. et al. A rat model of post-traumatic stress disorder reproduces the hippocampal deficits seen in the human syndrome. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. June, p. 1–8, 2012.

GRAHAM, D. R.; SIDHU, A. Mice Expressing the A53T Mutant Form of Human Alpha- Synuclein Exhibit Hyperactivity and Reduced Anxiety-Like Behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 88, n. 8, p. 1777–1783, 2010.

GREGORY, S. G. et al. A physical map of the mouse genome. **Nature**, v. 418, p. 743–750, 2002.

HALL, C. S. Emotional Behavior in the Rat. **Journal of comparative psychology**, v. 18, p. 385–403, 1934.

HAMANN, S. Sex differences in the responses of the human amygdala. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 11, n. 4, p. 288–293, 2005.

HAMEISTER, T. M. et al. Association of a locus on rat chromosome 4 with anxiety-related behaviors in two selectively bred rat lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 849, n. 4, p. 843–849, 2008.

HAO, X. et al. NMDA receptor antagonist enhances antidepressant efficacy and alleviates learning-memory function impairment induced by electroconvulsive shock with regulating glutamate receptors expression in hippocampus. **Journal of Affective Disorders**, v. 190, p. 819–827, 2016.

HAYDEN, E. C. Sex bias blights drug studies. **Nature**, v. 464, n. March, p. 332–333, 2010.

HOWELLS, F. M.; BINDEWALD, L.; RUSSELL, V. A. Behavioral and Brain Functions Cross-fostering does not alter the neurochemistry or behavior of spontaneously hypertensive rats. **behavioral and brain functions**, v. 11, p. 1–11, 2009.

IRLE, E. et al. Reduced amygdalar and hippocampal size in adults with generalized social phobia. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 126–131, 2010.

IZÍDIO, G. S. et al. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, n. 7, p. 412–419, 2005.

IZÍDIO, G. S. et al. The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 5-6, p. 329–340, 2011.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 136 p.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.

JACOB, H. J.; VRIES, H. DE; CORRENS, K. Functional Genomics and Rat Models. **Genome Research**, v. 9, n. 11, p. 1013–1016, 1999.

JAMES, W. **Principles of Psychology**. Holt, New York, NY, USA, 1890. Disponível em: <https://archive.org/stream/theprinciplesofp01jameuoft/theprinciplesofp01jameuoft_djvu.txt>. Acesso em: 11 de setembro de 2015.

JOELS, M.; FERNANDEZ, G.; ROOZENDAAL, B. Stress and emotional memory : a matter of timing. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 6, p. 281–288, 2011.

KHEIRBEK, M. A. et al. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. **Neuron**, v. 77, n. 5, p. 955–968, 2013.

KOOLHAAS, J. M. et al. Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 307–321, 2010.

LANDER, E.; KRUGLYAK, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. **Nature genetics**, v. 11, n. 3, p. 241–247, 1995.

LAZAR, J. et al. Impact of genomics on research in the rat. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 1717–1728, 2005.

LIANG, T.; CARR, L. G. Regulation of alpha-synuclein expression in alcohol-preferring and -non preferring rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 2, p. 470–482, 2006.

LLAMAS, B. et al. QTL mapping for traits associated with stress neuroendocrine reactivity in rats. **Mammalian Genome**, v. 16, p. 505–515, 2005.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, A. et al. A spontaneous deletion of α -synuclein is associated with an increase in CB1 mRNA transcript and receptor expression in the hippocampus and amygdala: effects on alcohol consumption. **Synapse**, v. 67, n. 6, p. 280–289, 2013.

MACHADO, M. L. et al. Influence of anxiety in spatial memory impairments related to the loss of vestibular function in rat. **Neuroscience**, v. 218, p. 161–169, 2012.

MADSEN, O. et al. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. **Nature**, v. 409, p. 610–614, 2001.

MASHIMO, T.; SERIKAWA, T. Rat Resources in Biomedical Research. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 214–220, 2009.

MATHEWS, A. Why Worry? the Cognitive Function. **Behaviour Research and Therapy**, v. 28, n. 6, p. 455–468, 1990.

MAURICIO, R. MAPPING QUANTITATIVE TRAIT LOCI IN PLANTS: USES AND CAVEATS FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. May, p. 370–381, 2001.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 1–28, 2004.

MCFARLAND, D. **The Oxford Companion to Animal Behaviour**. New York: Oxford University Press, 1987. 672 p.

MEDEIROS, G. F. DE; CORRÊA, F. J.; CORVINO, M. E. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes : The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. **World Journal of Neuroscience**, v. 4, n. June, p. 203–215, 2014a.

MEDEIROS, G. F. DE; CORRÊA, F. J.; CORVINO, M. E. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes : The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. **World Journal of Neuroscience**, v. 4, n. June, p. 203–215, 2014b.

METNA-LAURENT, M. et al. Bimodal Control of Fear-Coping Strategies by CB1 Cannabinoid Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 21, p. 7109–7118, 2012.

MILLER, M. M.; MORRISON, J. H.; MCEWEN, B. S. Basal anxiety-like behavior predicts differences in dendritic morphology in the medial prefrontal cortex in two strains of rats. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 280–288, 2012.

MONTGOMERY, K. THE RELATION BETWEEN FEAR INDUCED . BY NOVEL STTMULATfON AND EXPLORATORY BEHAVIOR. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254–260, 1955.

MOORE, K. J.; NAGLE, D. L. COMPLEX TRAITS ANALYSIS IN THE MOUSE: The Strengths, The Limitations and The Promise Yet To Come. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 653–686, 2000.

MORMEDE, P. et al. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 563–583, 2002.

MORRIS, E. P.; STEWART, S. H.; HAM, L. S. The relationship between social anxiety disorder and alcohol use disorders: A critical review. **Clinical Psychology Review**, v. 25, n. 6, p. 734–760, 2005.

MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; JOHNSON, W. E. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. **Nature**, v. 409, p. 614–618, 2001.

OBINU, M. C. et al. Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances ACh transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. **Progress in Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v. 26, p. 913–918, 2002.

OHL, F. Testing for anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v. 3, n. 4–5, p. 233–238, 2003.

PEÑA-OLIVER, Y.; BUCHMAN, V. L.; STEPHENS, D. N. Lack of involvement of alpha-synuclein in unconditioned anxiety in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 234–240, 2010.

PENG, X. M. et al. α -Synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 3523–3529, 2005.

PEREZ, R. G. et al. A Role for α -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3090–3099, 2002.

PERFEITO, R.; REGO PROF., A. C. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. **Revista Neurociencias**, v. 20, n. 2, p. 273–284, 2012.

PICETTI, R. et al. Dose preference and dose escalation in extended-access cocaine self-administration in Fischer and Lewis rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 211, n. 3, p. 313–323, 2010.

PICETTI, R. et al. Dose escalation and dose preference in extended-access heroin self-administration in Lewis and Fischer rats. **Psychopharmacology**, v. 220, n. 1, p. 163–172, 2012.

PLOMIN, R.; OWEN, M. J.; MCGUFFIN, P. The Genetic Basis of Complex Human Behaviors. **Science**, v. 1, n. 1992, p. 1733–1739, 1994.

PONDER, C. A. et al. Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 8, p. 736–749, 2007.

POTENZA, M. N. et al. Genomic Regions Controlling Corticosterone Levels in Rats. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 6, p. 634–641, 2004.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57–69, 1997.

RAMOS, A. et al. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular psychiatry**, v. 4, p. 453–462, 1999.

RAMOS, A. et al. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, v. 129, n. 1-2, p. 113–123, 2002.

RAMOS, A. et al. Genetic Selection of Two New Rat Lines Displaying Different Levels of Anxiety-Related Behaviors. **Behavior genetics**, v. 33, n. 6, p. 657–668, 2003.

RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 22, n. 1, p. 33–57, 1998.

RAT GENOME DATABASE WEB SITE, Medical College of Wisconsin. Marker search. Disponível em: <<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/markers.html>>. Acesso em: 03 de Março de 2014.

RIBEIRO, A. M. et al. Brain and Cognition Sex differences in aversive memory in rats: Possible role of extinction and reactive emotional factors. **Brain and Cognition**, v. 74, n. 2, p. 145–151, 2010.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997.

ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, p. 213–238, 2000.

ROOZENDAAL, B. Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval. **Neurobiology of learning and memory**, v. 595, p. 578–595, 2002.

ROSSATO, J. I. et al. A link between the Hippocampal and the Striatal Memory Systems of the Brain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 515–523, 2006.

ROY, V. et al. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: Evidence for new behavioral interpretations during test and retest. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 1, p. 131–141, 2009.

ROY, V.; CHAPILLON, P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. **Behavioural Brain Research**, v. 154, n. 2, p. 439–448, 2004.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit /

hyperactivity disorder (AD / HD). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 31–39, 2000.

SAGVOLDEN, T. et al. Rodent Models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1239–1247, 2005.

SAMANAS, N. B. et al. Genetic Etiology of Renal Agenesis : Fine Mapping of Renag1 and Identification of Kit as the Candidate Functional Gene. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. 1–23, 2015.

SCHWABE, L.; WOLF, O. T. Stress Modulates the Engagement of Multiple Memory Systems in Classification Learning. **The journal of neuroscience**, v. 32, n. 32, p. 11042–11049, 2012.

SILVA, G. J. et al. Genetic mapping of a new heart rate QTL on chromosome 8 of spontaneously hypertensive rats. **BMC Medical Genetics**, v. 8, n. 1, p. 17, 2007.

SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task : a new model to study memory – anxiety interactions . Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **Journal of neuroscience methods**, v. 102, p. 117–125, 2000.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behavioural brain research**, v. 229, n. 1, p. 289–300, 1 abr. 2012.

SORGE, R. E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 3–5, 2015.

STERNBERG, E. M. et al. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. **Brain Research**, v. 570, p. 54–60, 1992.

TECOTT, L. H. Reviews and Overviews The Genes and Brains of Mice and Men. **The American Journal of Psychiatry**, v. 160, p. 646–656, 2003.

TERENINA-RIGALDIE, E.; JONES, B. C.; MORMEDE, P. Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. **Genes, Brain and Behavior**, v. 2, n. 3, p. 125–131, 2003.

TERRA, M. B. et al. Social anxiety disorder in 300 patients hospitalized for alcoholism in Brazil: high prevalence and undertreatment. **Comprehensive Psychiatry**, v. 47, n. 6, p. 463–467, 2006.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. 1–12, 2002.

VENDRUSCULO, L. F. et al. Evidence for a female-specific effect of chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes, brain and behavior**, v. 5, n. 6, p. 441–450, 2006.

WALD, C.; WU, C. Of Mice and Women : The Bias in Animal Models. **Science**, v. 327, p. 1571–1572, 2009.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Anxiogenic Effects of High Illumination Levels Assessed with the Acoustic Startle Response in Rats. **Biological Psychiatry**, v. 42, n. 96, p. 461–471, 1997.

WANG, C. et al. Chronic mild stress-induced changes of risk assessment behaviors in mice are prevented by chronic treatment with fluoxetine but not diazepam. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 116–128, 2014.

WERSINGER, C. et al. Modulation of dopamine transporter function by α - synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. **The FASEB journal**, n. 8, p. 5–8, 2003.

WERSINGER, C.; SIDHU, A. Attenuation of dopamine transporter activity by α -synuclein. **Neuroscience letters**, v. 340, p. 189–192, 2003.

WINTERS, B. D.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 5, p. 1055–1070, 2008.

YERKES, R. M.; DODSON, J. D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. **Journal of comparative neurology and psychology**, v. 18, n. 5, p. 459–482, 1908.